

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

REGINA MARIA TOKUNAGA

**DETERMINAÇÃO DA FENILALANINA EM RECÉM-NASCIDOS E CRIANÇAS NA
TRIAGEM DA FENILCETONÚRIA PELOS MÉTODOS DE FLUOROMETRIA E DE
ESPECTROMETRIA DE MASSAS NO ESTADO DO PARANÁ**

CURITIBA

2011

REGINA MARIA TOKUNAGA

**DETERMINAÇÃO DA FENILALANINA EM RECÉM-NASCIDOS E CRIANÇAS NA
TRIAGEM DA FENILCETONÚRIA PELOS MÉTODOS DE FLUOROMETRIA E DE
ESPECTROMETRIA DE MASSAS NO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Pediatria, área de concentração em Triagem Neonatal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosana Marques Pereira
Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

CURITIBA

2011

*À Fundação Ecumênica de Proteção ao
Excepcional (FEPE), na pessoa do seu
presidente sr. José Alcides Marton da Silva,
pelas amostras, equipamentos e reagentes
fornecidos para esta pesquisa.*

*Ao Prof. Dr. Ehrenfried Othmar Wittig, pelo
incentivo e apoio na realização deste trabalho.*

*À coordenadora do Centro de Pesquisas da
FEPE, Mouseline Torquato Domingos pela
oportunidade de desenvolver a pesquisa no
laboratório.*

*À minha doce galerinha: Ana Maria, Maria
Fernanda, Mateus Kazuo e Isabela Yumi
(que está chegando) por me tornarem a
avó mais feliz do mundo.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus que é o Senhor de todas as coisas, pela oportunidade que me deu de ampliar meus conhecimentos, pela saúde que me tem dado e pela Sua presença em minha vida.

Em especial, aos meus familiares que me apoiaram e as minhas colegas de bancada da FEPE: Alexandra, Marta e Maria Aparecida, que sempre me incentivaram.

Ao Yuri Cleverthon Sica, que muito me ajudou com a realização dos ensaios no espectrômetro de massas.

Ao pessoal técnico auxiliar do Centro de Pesquisas da FEPE: minhas queridas coleguinhas de trabalho.

Às assistentes sociais da FEPE: Cleuza, Adriana, Simone e Marlene, bem como todo o pessoal da secretaria.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Rosana Marques Pereira pela atenção e paciência durante este tempo de caminhada.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Geraldo Picheth que foi meu guia e o meu grande ajudador para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná e aos orientandos do professor Geraldo neste período, em especial, à Izabela.

Enfim, muitas pessoas direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho. A todas, os meus mais sinceros agradecimentos.

*Sede como os pássaros que, ao pousarem
um instante sobre ramos muito leves, sentem-
nos ceder, mas cantam! Eles sabem que
possuem asas.*

Victor Hugo

RESUMO

A fenilcetonúria (FNC) é um erro inato no metabolismo do aminoácido fenilalanina (FAL) que causa retardo mental grave se não for tratada nos primeiros dias de vida. A triagem neonatal para FCN é importante para identificar os afetados e, com o tratamento, prevenir sequelas neurológicas em recém-nascidos. Este estudo teve como objetivo analisar o desempenho analítico dos ensaios fluorométrico e de espectrometria de massas não derivatizada, na quantificação da fenilalanina em recém-nascidos e crianças do Estado do Paraná. As amostras foram obtidas do laboratório da Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE) responsável pela triagem neonatal em todo o Estado. O projeto tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFPR. As amostras de sangue seco (n = 528) foram classificadas em seis grupos com diferentes características. Grupo 1 (G1 n = 108), grupo controle: recém-nascidos com peso $\geq 2,5\text{kg}$ e coleta após 48h do nascimento. Grupo 2 (G2 n = 84), grupo coleta precoce: recém-nascidos em que a coleta ocorreu antes de 48h após o nascimento. Grupo 3 (G3 n = 84), grupo 2ª coleta: indivíduos do grupo G2 coletados após 48h de vida. Grupo 4 (G4, n = 49), grupo baixo peso: recém-natos com baixo peso ($\leq 2,2\text{kg}$). Grupo 5 (G5, n = 80), grupo limítrofe, recém-nascidos que apresentaram concentrações de FAL com valores limítrofes, entre 2,1 e 2,9mg/dL, obtidos pelo método fluorométrico e Grupo 6 (G6, n = 123), pacientes portadores de fenilcetonúria em acompanhamento clínico no período de 2008 a 2009. A concentração de fenilalanina foi consistentemente e significativamente maior no método de espectrometria de massas (*NeoGram® Amino Acids and Acylcarnitines Non-derivatized Tandem Mass Spectrometry Kit, Micro Mass QuattroMicro, PerkinElmer*) quando comparado ao método fluorométrico automatizado (*Wallac Neonatal Phenylalanine® kit, PerkinElmer*). A concentração de fenilalanina em amostras de recém-natos coletadas antes de 48h de vida (G2) e comparadas às coletadas após 48h do nascimento (G3), não foi significativamente diferente. Crianças com baixo peso (G4) não apresentaram alterações nas concentrações de FAL quando comparadas ao grupo controle (G1). Em síntese, é necessário adequar o valor de normalidade para a fenilalanina (valor de corte) conforme o método utilizado na triagem neonatal, pois as respostas analíticas diferem devido à sensibilidade e especificidade da metodologia empregada.

Palavras-chave: Fenilcetonúria; Triagem Neonatal; Fluorometria; Espetrometria de Massas.

ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU) is an inborn error of phenylalanine (Phe) metabolism that results in severe mental retardation if not treated within the first days of life. Newborn screening for PKU is important to identify affected individuals and to prevent, with treatment, neurological sequelae in newborns. The aim of this study was to evaluate the analytical performance of fluorometric assay and non-derivatized mass spectrometry to quantify Phe in newborns and children of the State of Paraná. The samples were obtained from the laboratory of the Ecumenical Foundation for Protection of Disabled Individuals (Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional - FEPE), which is responsible for newborn screening throughout the state. The study was approved by the Ethics Committee on Human Research at UFPR. The dried blood samples (n = 528) were classified into six groups with different characteristics. Group 1 (G1 n = 108), control group: newborns weighing ≥ 2.5 kg whose samples were collected after 48 h of life. Group 2 (G2 n = 84), early collection group: the samples were collected from the newborns before 48h of life. Group 3 (G3 n = 84), second collection group: the samples were collected from the infants of Group 2 after 48h of life. Group 4 (G4, n = 49), low weight group: neonates with low birth weight (≤ 2.2 kg). Group 5 (G5 n = 80), borderline group: neonates with borderline Phe levels, between 2.1 and 2.9mg/dL, determined by the fluorometric method. Group 6 (G6 n = 123): PKU patients during the clinical follow-up period from 2008 to 2009. The Phe concentration measured by the mass spectrometry method (*Neogram® Amino Acids and Non-derivatized Acylcarnitines Tandem Mass Spectrometry Kit, Micro Mass Quattro Micro*, PerkinElmer) was consistently and significantly higher when compared to the result obtained by the automated fluorometric method (*Neonatal Phenylalanine® kit*, PerkinElmer). The Phe concentration in samples collected from newborns under 48h of age (G2) was not significantly different in comparison to samples collected after 48h of birth (G3). Low-birth-weight infants (G4) did not present alterations in the Phe values when compared to the control group (G1). In summary, it is necessary to adjust the normal range for phenylalanine (cutoff value) according to the method used for newborn screening, because the analytical results are different due to the sensitivity and specificity of the method employed.

Keywords: Phenylketonuria;, Newborn Screening; Fluorometric; Mass spectrometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTUDO COMPARATIVO DOS MÉTODOS FLUOROMÉTRICO E MS/MS	18
FIGURA 2 - DR. ROBERT GUTHRIE	23
FIGURA 3 - METABOLISMO DA FENILALANINA	28
FIGURA 4 - CAPACIDADE INTELECTUAL TÍPICA EM PACIENTES FNC NÃO TRATADOS	30
FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO ÉTNICA DA FNC	42
FIGURA 6 - DESENHO ESQUEMÁTICO DE HERANÇA AUTOSSÔMICA RECESSIVA.....	43
FIGURA 7 - MOLÉCULA DE FENILALANINA (FAL)	45
FIGURA 8 - MOLÉCULA DE TIROSINA (TIR)	46
FIGURA 9 - FENILALANINA HIDROXILASE (FAH) - FIGURA ESPACIAL	47
FIGURA 10 - LOCALIZAÇÃO MOLECULAR DA FAH NO CROMOSSOMO 12 ...	48
FIGURA 11 - MECANISMO DE AÇÃO DA (BH ₄) NA HIDROXILAÇÃO DA FAL	49
FIGURA 12 - FLUORÔMETRO <i>Victor 1420-020®</i> (Wallac-PerkinElmer).....	54
FIGURA 13 - SISTEMA MS/MS <i>Micro Mass Quattro Micro®</i>	56
FIGURA 14 - DESENHO ESQUEMÁTICO DE UM FLUORÔMETRO.....	61
FIGURA 15 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO MS/MS	63
FIGURA 16 - ENSAIO FLUOROMÉTRICO MODIFICADO	69
FIGURA 17 - DISPENSADOR <i>NICHIRYO</i> (WALLAC – PERKINELMER).....	71
FIGURA 18 - EQUIPAMENTO <i>DELFLIA-PLATE DISPENSER</i> (WALLAC-PERKINELMER)	72
FIGURA 19 - ESPECTROS NORMAL E ALTERADO DA FENILALANINA	74
FIGURA 20 - CONCENTRAÇÕES DE FENILALANINA NOS TEMPOS "ZERO" E APÓS 24, 48 E 72H EM AMOSTRA MANTIDA À 37°C	77
FIGURA 21 - ANÁLISE DE REGRESSÃO PARA O GRUPO CONTROLE (G1)	80
FIGURA 22 - ANÁLISE DE REGRESSÃO GRUPO COLETA PRECOCE (G2)	80
FIGURA 23 - ANÁLISE DE REGRESSÃO GRUPO 2. ^a COLETA (G3).....	81
FIGURA 24 - ANÁLISE DE REGRESSÃO GRUPO BAIXO PESO (G4)	81
FIGURA 25 - ANÁLISE DE REGRESSÃO GRUPO LÍMITROFE (G5)	82

FIGURA 26 - ANÁLISE DE REGRESSÃO DO GRUPO FNC (G6)	82
FIGURA 27 - ANÁLISE DE REGRESSÃO DO TOTAL DE AMOSTRAS.....	83
FIGURA 28 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE FENILALANINA (FAL) E DA RAZÃO FENILALANINA/ TIROSINA (FAL/TIR) NOS GRUPOS EM ESTUDO	84
FIGURA 29 - FLUXOGRAMA PARA A CARACTERIZAÇÃO DA HIPERFENILALANINEMIA COMPARANDO OS VALORES DE CORTE RECOMENDADOS PELAS DIRETRIZES DE 2002 E 2010 DO MINISTÉRIO DA SAÚDE.....	94

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS EM ESTUDO	67
QUADRO 2 - ANALITOS ANALISADOS NO MS/MS <i>Micro Mass Quattro Micro®</i>	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO DA FENILALANINA - PROTOCOLO DA FEPE	55
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS NOS DIFERENTES GRUPOS	76
TABELA 3 - ANÁLISE DA VARIABILIDADE ANALÍTICA INTERENSAIO PARA A FENILALANINA NOS MÉTODOS DE FLUOROMETRIA E DE ESPECTOMETRIA DE MASSAS	78
TABELA 4 - MÉDIA, DP E MEDIANA DOS VALORES DE FAL AVALIADOS NOS DIFERENTES GRUPOS PELOS MÉTODOS DE FLUOROMETRIA E DE ESPECTOMETRIA DE MASSAS, E DA TIR E RELAÇÃO FAL/TIR AVALIADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	78
TABELA 5 - COMPARAÇÃO DE RESULTADOS DA FAL POR FLUOROMETRIA E POR MS/MS UTILIZANDO O TESTE t STUDENT E A CORRELAÇÃO DE PEARSON	79
TABELA 6 - SUMÁRIO DAS ANÁLISES DE REGRESSÃO PARA AS AMOSTRAS EM ESTUDO	79
TABELA 7 - ANÁLISE DOS RESULTADOS DA FENILALANINA POR FLUOROMETRIA E POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA OS GRUPOS CONTROLE, LIMÍTROFE E FNC, E DA RELAÇÃO FAL/TIR.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFEH	- Associação dos Fenilcetonúricos e Homocistinúricos
APAE-SP	- Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de São Paulo
BH ₄	- Tetrahydrobiopterina
BIA	- Teste de Inibição Bacteriana (sigla em inglês)
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNAc	- Ácido Desoxirribonucleico complementar
EIM	- Erro Inato do Metabolismo
ESI MS/MS	- MS/MS de Ionização por <i>Eletrospray</i>
EI MS/MS	- MS/MS de Ionização por Impacto de Elétrons
FAH	- Fenilalanina Hidroxilase
FAL	- Fenilalanina
FAL/TIR	- Razão Fenilalanina/Tirosina
FAO/WHO	- Organização da Agricultura e Alimentos/Organização Mundial da Saúde (<i>Food and Agriculture Organization/World Health Organization</i>)
FEPE	- Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional
FNC	- Fenilcetonúria
GTPCH	- Guanosina-Trifosfato-Ciclohidrolase
HC	- Hospital de Clínicas
HFA	- Hiperfenilalaninemia
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (<i>Hight Performance Liquid Chromatography</i>)
INTA	- Instituto de Nutrição e Tecnologia dos Alimentos
MRM	- Modo de Reação Monitorada
MS	- Ministério da Saúde
MS/MS	- Espectrometria de massas sequencial (em <i>tandem</i>)
MS1	- Quadrupolo 1 do MS/MS
MS3	- Quadrupolo 2 do MS/MS
PCDT	- Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PNTN	- Programa Nacional de Triagem Neonatal
PTN	- Programa de Triagem Neonatal

PTPS	- Piruvil–Tetrahidrobiopterina-Sintetase
PKU	Fenilcetonúria (<i>Phenylketonuria</i>)
Q1	- Célula de colisão do MS/MS
QI	- Coeficiente de Inteligência
RNA	- Ácido Ribonucléico
SNC	- Sistema Nervoso Central
TIR	- Tirosina
T _r	Tempo de Retenção
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 JUSTIFICATIVA	19
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivo primário	19
1.2.2 Objetivos secundários	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 FENILCETONÚRIA	21
2.1.1 Histórico	21
2.1.2 Robert Guthrie	23
2.2 HIPERFENILALANINEMIA - DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO	24
2.3 FISIOPATOLOGIA DAS HIPERFENILALANINEMIAS	26
2.3.1 Hiperfenilalaninemia benigna ou transitória	26
2.3.2 Hiperfenilalaninemia persistente	27
2.3.3 Hiperfenilalaninemia clássica: fenilcetonúria	27
2.3.4 Hiperfenilalaninemia não-cetonúrica ou atípica	31
2.4 FENILCETONÚRIA MATERNA	32
2.5 TRATAMENTO DA FENILCETONÚRIA	33
2.6 TRATAMENTO DA FENILCETONÚRIA ATÍPICA	36
2.7 TRATAMENTOS ALTERNATIVOS DA FNC	37
2.7.1 Suplementação com aminoácidos neutros	37
2.7.2 Suplementação com BH ₄	38
2.7.3 Terapia enzimática com fenilalanina amônia-liase	39
2.7.4 Terapia gênica	39
2.8 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA FNC	41
2.9 ERROS INATOS DO METABOLISMO (EIM)	42
2.10 MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA FISIOPATOLOGIA DA FENILCETONÚRIA: FENILALANINA, TIROSINA, FENILALANINA- HIDROXILASE E TETRAHIDROBIOPTERINA	44
2.10.1 Fenilalanina (FAL)	44
2.10.2 Tirosina (TIR)	45
2.10.3 Fenilalanina-hidroxilase (FAH)	46

2.10.3.1	Gene da fenilalanina-hidroxilase	47
2.10.4	Tetrahidrobiopterina (BH ₄)	49
2.10.5	Características necessárias a um programa de triagem populacional (adaptado de <i>National Screening Committee</i> , 1998)	50
2.10.6	A importância da triagem neonatal	51
2.10.7	A triagem neonatal no Brasil	51
2.10.8	A triagem neonatal no Paraná	53
2.11	MÉTODOS UTILIZADOS EM TRIAGEM NEONATAL DA FNC	56
2.11.1	Método qualitativo	57
2.11.2	Métodos semiquantitativos	57
2.11.2.1	Teste de inibição bacteriana (BIA)	57
2.11.2.2	Cromatografia de aminoácidos em camada delgada (CCD)	58
2.11.3	Métodos quantitativos	58
2.11.3.1	Método enzimático colorimétrico utilizando a fenilalanina- desidrogenase (método <i>Quantase</i>)	59
2.11.3.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC)	59
2.11.3.3	Método fluorométrico	60
2.11.3.4	Método de espectrometria de massas em <i>tandem</i> (MS/MS)	61
3	MATERIAL E MÉTODOS	65
3.1	CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO	65
3.2	AMOSTRAS	65
3.2.1	Análise das características das amostras entre os grupos estudados	67
3.2.2	Análise da estabilidade da FAL em tempo "zero", 24, 48 e 72h em amostras mantidas em temperatura de 37°C	67
3.2.3	Análise da variabilidade analítica interensaio	68
3.2.4	Análise dos resultados das amostras por fluorometria e por espectrometria de massas nos grupos avaliados	68
3.3	PREPARO DAS AMOSTRAS	69
3.3.1	Método fluorométrico modificado (McCaman e Robins)	69
3.3.1.1	Desenvolvimento do ensaio	70
3.3.2	Método de espectrometria de massas em <i>tandem</i> não derivatizado	72
3.3.2.1	Desenvolvimento do ensaio	72
3.3.3	Análitos quantificados no MS/MS	73
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	74

4 RESULTADOS	76
4.1 CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS	76
4.1.1 Análise da estabilidade da FAL em tempo "zero", 24, 48 e 72h em amostras mantidas à 37°C.....	77
4.1.2 Análise da variabilidade analítica interensaio	77
4.1.3 Análise dos resultados para a fenilalanina nos grupos avaliados utilizando-se os métodos de fluorometria automatizada e de espectrometria de massas em <i>tandem</i> não derivatizado.....	78
4.1.4 Análise da concentração de FAL por fluorometria e por espectrometria de massas para os grupos: controle, limítrofe e indivíduos com FNC.....	83
4.1.5 Concentração da fenilalanina frente aos valores de corte dos PCDTs de 2002 e de 2010 do Ministério da Saúde	84
5 DISCUSSÃO	85
5.1 CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS	85
5.1.2 Estabilidade da FAL em tempo "zero", 24, 48 e 72h em amostra mantida à 37°C	86
5.1.3 Variabilidade analítica interensaio.....	87
5.1.4 Análise dos resultados quanto à concentração de FAL pelos métodos fluorométrico e de espectrometria de massas.....	87
5.1.5 Análises de regressão	90
5.1.6 Concentração de fenilalanina (FAL) e relação fenilalanina/tirosina (FAL/TIR) dos grupos controle, limítrofe e FNC frente aos valores de corte do PCDT de 2002 e 2010	93
6 CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS.....	97
ANEXO 1 - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS	110
ANEXO 2 - PORTARIA N.º 712, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2010.....	112
ANEXO 3 - TÉCNICA DE COLETA EM PAPEL FILTRO PARA O "TESTE DO PEZINHO" EM RECÉM-NASCIDOS	121
ANEXO 4 - FICHA DE COLETA PARA O TESTE DO PEZINHO - FEPE	124
ANEXO 5 - PROTOCOLO DE ANÁLISE PARA FAL NO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DO ESTADO DO PARANÁ (FEPE).....	126

ANEXO 6 - EXPERIMENTO DE ALIMENTAÇÃO CONJUNTA: FÓRMULA E ALEITAMENTO MATERNO – HC – SERVIÇO DE ENDÓCRINO-PEDIATRIA - UFPR	128
ANEXO 7 - RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO DE FENILALANINA PELOS MÉTODOS DE FLUOROMETRIA E DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS QUANDO SUBMETIDOS AO CONTROLE DE QUALIDADE INTERNACIONAL CDC DE ATLANTA.....	130
ANEXO 8 - O LABORATÓRIO DE TRIAGEM NEONATAL E AS DIRETRIZES PARA O DIAGNÓSTICO DA FENILCETONÚRIA.....	132

1 INTRODUÇÃO

O termo hiperfenilalaninemia (HFA) refere-se, de maneira ampla, à concentração aumentada de fenilalanina (FAL) no sangue caracterizando o processo patológico mais frequente no grupo de erros inatos do metabolismo.

Em cerca de 98% dos casos, a HFA é devida à deficiência total ou parcial da enzima fenilalanina-hidroxilase (FAH) que promove, no fígado, a hidroxilação da FAL convertendo-a em tirosina (TIR). Esta deficiência, na sua forma mais grave, recebe o nome de fenilcetonúria clássica (FNC) (SCRIVER; KAUFMAN, 2001).

A HFA pode ocorrer ainda por defeito na síntese ou na regeneração do sistema da coenzima tetrahidrobiopterina (BH₄) que funciona como cofator da reação de hidroxilação. Esta doença é então denominada HFA atípica ou não-cetonúrica (CORNEJO; RAIMANN, 1999; MIRA; MARQUEZ, 2000).

A prevalência da FNC no Brasil situa-se entre 1:12.000 a 1:15.000 nascidos vivos, com predominância na população caucasiana, sendo a aminoacidopatia mais comum na Europa (MIRA; MARQUEZ, 2000).

Altas concentrações séricas de FAL ativam vias metabólicas de transaminação secundária e o excesso deste aminoácido é convertido a fenilpiruvato. O acúmulo deste metabólito no sangue produz lesão no sistema nervoso central iniciando sequelas neurológicas na criança, já nos primeiros dias de vida

O tratamento é exclusivamente dietoterápico e deve ser instituído a partir do momento do diagnóstico da doença. A detecção precoce é fundamental para prevenir os efeitos deletérios no sistema nervoso do recém-nato (VILARINHO *et al.*, 2006).

No Brasil, o teste de triagem neonatal é conhecido como "Teste do Pezinho" e desde 13 de julho de 1990 (Lei Federal n.º 8.069 - Estatuto da Criança e do Adolescente) tornou-se gratuito e obrigatório em todo o território nacional. No entanto, somente a partir de 06 de junho de 2001, houve a regulamentação do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) com a Portaria do Ministério da Saúde MS/GM n.º 822. Esta lei determina a pesquisa para quatro doenças: fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, fibrose cística e doença falciforme, as quais foram implantadas gradualmente em cada Estado brasileiro, conforme a infraestrutura local.

O Programa de Triagem Neonatal do Estado do Paraná é realizado pela Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE), considerado um serviço

de referência nacional. Estima-se que até meados de 2011 foram triados cerca de 3.487.000 recém-nascidos e diagnosticados 145 casos de fenilcetonúria (dados da FEPE - 2011). Desde 1987, a análise da fenilalanina é realizada por método fluorométrico.

Em fevereiro de 2007, a FEPE recebeu recurso financeiro da Secretaria do Estado da Ciência e da Tecnologia para a aquisição do equipamento de espectrometria de massas (MS/MS) *Micromass Quattro Micro (Wallac)*. Este equipamento possibilita a pesquisa de 26 erros inatos do metabolismo entre aminoacidopatias, acidúrias orgânicas e defeitos da β -oxidação dos ácidos graxos.

O fabricante dos *kits* de fluorometria e de espectrometria de massas em *tandem* não derivatizada (PerkinElmer) realizou, em 2005, um estudo não publicado e presente na bula do *kit* (*PERKINELMER LIFE AND ANALYTICAL SCIENCES, W.O. NeoGram® PKU tandem mass spectrometry kit*) com mais de 3 mil amostras, comparando os resultados obtidos na determinação da fenilalanina por ambos os métodos, como mostrado na Figura 1. Observa-se que, em ambos os métodos, ocorreu variação da resposta analítica nas diferentes concentrações de fenilalanina.

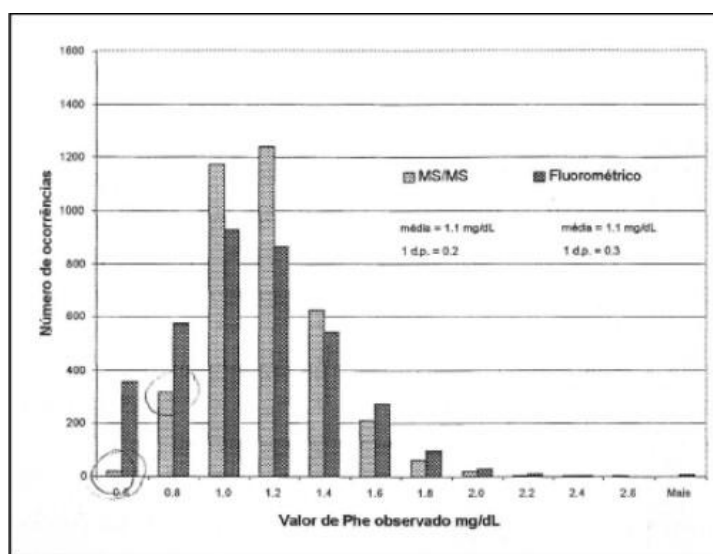


FIGURA 1 - ESTUDO COMPARATIVO DOS MÉTODOS FLUOROMÉTRICO E MS/MS

FONTE: Perkinelmer Life and Analytical Sciences (2005)

Em 17 de dezembro de 2010, foi publicado pela Secretaria de Atenção à Saúde Ministério da Saúde, Portaria SAS/MS n.º 712, um novo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT). Este protocolo discorre sobre várias doenças metabólicas padronizando o diagnóstico e procedimentos clínicos e terapêuticos, incluindo a fenilcetonúria. Para o diagnóstico laboratorial desta aminoacidopatia, em triagem

neonatal, está preconizada a coleta a partir de 48h de vida, ou seja, após o início da dieta proteica, estendendo-se até o 5.º dia após o nascimento. Crianças com concentrações elevadas de fenilalanina devem ser encaminhadas para avaliação diagnóstica. São considerados valores anormais de fenilalanina, conforme a nova diretriz, concentrações maiores que 2mg/dL ou 120mmol/L. Este resultado deve ser confirmado numa 2.ª análise quantitativa da fenilalanina e da tirosina para o cálculo da relação fenilalanina/tirosina (FAL/TIR). Valores desta relação > 3 , (conforme o PCDT 2010) ou $> 2,5$ (conforme bula do *kit PerkinElmer*, 2007a) confirmam o diagnóstico de FNC (CHACE *et al.*, 1998; CORNEJO; RAIMAN, 1999; CEGLAREK *et al.*, 2002; CHACE; KALAS, 2005).

A Portaria SAS/MS n.º 712 que regulamenta a pesquisa, diagnóstico clínico e laboratorial, critérios de inclusão e exclusão, serviço de referência para triagem neonatal e tratamento para a fenilcetonúria consta no Anexo 2.

1.1 JUSTIFICATIVA

Com a aquisição do espectrômetro de massas, *Micromass Quattro Micro®* (Wallac), pela Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE) que realiza a triagem neonatal para a fenilcetonúria no Estado do Paraná, houve o interesse de se comparar o desempenho analítico do método em uso, fluorimetria, com o método de espectrometria de massas, avaliando-se os resultados obtidos para os diferentes grupos de amostras que compõem este estudo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo primário

Comparar as principais características analíticas das metodologias fluorométrica e de espectrometria de massas para detecção e quantificação da FAL em amostra de sangue seco coletadas em papel filtro.

1.2.2 Objetivos secundários

- a) Avaliar o desempenho analítico da fluorometria e da espectrometria de massas como: linearidade, imprecisão, sensibilidade e interferentes.
- b) Comparar os resultados da determinação da espectrometria de massas para detecção e quantificação da FAL com o procedimento padronizado de fluorometria automatizada nos grupos estudados.
- c) Avaliar a determinação da fenilalanina em RNs antes e após 48h de vida.
- d) Avaliar a determinação da fenilalanina em RNs com baixo peso.
- e) Estudar a viabilidade analítica e econômica do ensaio de espectrometria de massas para determinação da FAL em recém-nascidos visando à implementação deste ensaio na triagem neonatal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FENILCETONÚRIA

2.1.1 Histórico

Em 1934 Asbjörn Fölling, médico e bioquímico norueguês, descreveu pela primeira vez a doença, ao observar dois irmãos com atraso mental e com odor corporal peculiar. Constatou que a urina excretada por estes indivíduos exalava um odor característico e, quando acidificadas com gotas de cloreto férrico, apresentavam uma coloração verde intensa. Apesar da escassez dos recursos da sua época, mas tendo um elevado conhecimento em química, Fölling conseguiu comprovar que a cor e o odor da urina eram devidos à presença do ácido fenilpirúvico. Baseando-se nestes dados, descreveu a doença como uma alteração metabólica hereditária dando-lhe a designação de oligofrenia fenilpirúvica. Em 1935, Fölling constatou que a doença tinha característica autossômica recessiva, mas somente em 1937, Penrose e Quastel ¹a denominaram de fenilcetonúria, o que tem prevalecido até os dias de hoje (TOURYAN; SIDBURY, 1978).

Em 1953, Jervis conseguiu demonstrar que a atividade hepática da fenilalanina-hidroxilase (FAH) era deficiente em doentes fenilcetonúricos, identificando a fenilalanina (FAL) como o marcador bioquímico da doença e precursor do ácido fenilpirúvico. Neste mesmo ano, Bickel descreveu a primeira possibilidade de terapia mediante a restrição de fenilalanina na dieta o que constitui, até a atualidade, a base do tratamento destes pacientes (TOURYAN; SIDBURY, 1978; BICKEL, 1987; ERLANDSEN; RAYMOND; STEVENS, 1999; SCRIVER; KAUFMAN, 2001; HENDRIKSZ; WALTER, 2004; VILARINHO *et al.*, 2006; MITCHELL; SCRIVER, 2007; WILLIAMS; MAMOTTE; BURNETT, 2008).

¹ PENROSE, L.; QUASTEL, J. H. Metabolic Studies in Phenylketonuria. **Biochem J**, v.31, p.266-274, 1937 *apud* TOURYAN; SIDBURY, 1978.

Em 1961, Dr. Robert Guthrie desenvolveu um método simples que permitiu a triagem neonatal da fenilalanina denominado "Teste de Inibição Bacteriana de Guthrie" (*BIA*).

Este teste possibilitou detectar indivíduos doentes e, conseqüentemente, a prevenção do retardo mental quando instituída a restrição dietética da FAL, já no período neonatal (GUTHRIE; SUSI, 1963). O teste *BIA* passou a ser recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a partir de 1968 (MATALON; MICHALS, 1991). Esta iniciativa conduziu à realização de programas de triagem neonatal para a fenilcetonúria, facultando o diagnóstico precoce da doença e o respectivo tratamento. Nos anos 70, estes programas já eram rotina na maioria dos países desenvolvidos (VILARINHO *et al.*, 2006).

A implantação da triagem neonatal a nível internacional permitiu, por sua evolução, a observação de que nem todas as hiperfenilalaninemias (HFAs) eram causadas por defeitos de atividade da enzima fenilalanina-hidroxilase (FAH) e que, em alguns casos, eram devidas a defeitos da síntese ou da regeneração do sistema cofator BH₄ (ECONOMOU-PETERSEN *et al.*, 1992).

O gene codificante da enzima fenilalanina-hidroxilase localizado no cromossoma 12q22-q24.1 foi identificado por Woo, nos anos 80 (WOO *et al.*, 1983).

Em 1985, Kwok e cols. isolaram e clonaram o DNAc da FAH humana (KWOK *et al.*, 1985) e na década de 90, Konecki obteve a sequência genômica completa do gene codificante da enzima fenilalanina-hidroxilase (KONECKI *et al.*, 1992; SCRIVER; KAUFMAN, 2001).

O isolamento do gene da FAH ampliou o conhecimento e a compreensão da função desta enzima quanto à relação mutação/atividade. Sua clonagem conduziu à identificação das primeiras mutações. Este número tem-se multiplicado desde então, sendo conhecidas, atualmente, cerca de 528 (BICKEL, 1987; SCHMIDT *et al.*, 1987; GÜTTLER; GULDBERG, 1994; VILARINHO *et al.*, 2006; PHOMMARINH; SCRIVER, 2007).

Concluiu-se que, devido à variabilidade das mutações no gene da FAL, obtem-se os vários graus de severidade das hiperfenilalaninemias e que os avanços na compreensão molecular trouxeram potencial para o desenvolvimento de novas terapias, ainda em estudo, (p.37 a 41) (MATALON; MICHALS, 1991).

Nos anos 90, iniciaram-se os primeiros ensaios de expressão, *in vitro*, de numerosos alelos da FAH mutados. Foram cristalizados vários domínios da enzima humana e realizaram-se os primeiros estudos sobre terapia gênica (ECONOMOU-PETERSEN *et al.*, 1992; SCRIVER; KAUFMAN, 2001; ERLANDSEN *et al.*, 2003).

A fenilcetonúria é uma das primeiras doenças genéticas humanas a ter uma terapia efetiva com restrição de FAL da dieta. Tal reconhecimento contribuiu para revolucionar a pesquisa acerca das doenças genéticas em geral (SCRIVER; KAUFMAN, 2001).

2.1.2 Robert Guthrie



FIGURA 2 - DR. ROBERT GUTHRIE
FONTE: www.isns-neoscreening.org

Robert Guthrie, médico norte-americano (1916-1995), foi pediatra e microbiologista da *University of New York*, em *Buffalo* e iniciou, em 1958, a aplicação do teste que havia desenvolvido para identificar a fenilalanina, denominando-o de Teste de Inibição Bacteriana (BIA), no qual utilizava o *Bacillus subtilis*. A finalidade era diagnosticar pacientes portadores de fenilcetonúria. Também idealizou e desenvolveu uma forma simples para coletar sangue total de crianças utilizando papel filtro, o que

possibilitava o envio da amostra à distância e permitia o início do tratamento dietético mais precocemente (WITTIG; DOMINGOS, 2007).

O teste de triagem populacional teve início na Escola Estadual Newark, primeiramente em crianças deficientes e que já eram conhecidas como fenilcetonúricas pelo teste do cloreto férrico na urina. Um dos pacientes detectados pelo teste *BIA* tinha apresentado resultado negativo para o teste do cloreto férrico, o que foi publicado em 1961 pelo Dr. Robert Guthrie. Neste mesmo ano, em Jamestown, New York, iniciou-se oficialmente a triagem neonatal para a fenilcetonúria. Ressalta-se que o Departamento da Criança foi criado, na época, para prevenir o retardo mental, devido à influência do presidente John F. Kennedy que tinha um irmão mentalmente deficiente. Em 1962, após a triagem de 800 crianças, foi detectado o primeiro caso de fenilcetonúria. No espaço de dois anos, foram triadas 400.000 crianças e detectados 39 casos, com uma prevalência de 1:10.000. Em 1963, o Estado de Massachussetts foi o primeiro a estabelecer uma lei obrigando a realização do teste para todos os recém-nascidos no Estado. Desde então, o *BIA* foi considerado teste padrão para triagem da fenilcetonúria durante vários anos. Em 1964, Dr Guthrie publicou os resultados do estudo-piloto com 400.000 recém-nascidos em 29 estados americanos, comprovando a eficácia do método na identificação precoce da FNC (CORNEJO; RAIMANN, 1999).

Dr. Robert Guthrie não patenteou o método da coleta de sangue em papel filtro (*Guthrie spot*), o que propiciou o baixo custo e a difusão mundial deste tipo de coleta (TUOTO, 2009).

2.2 HIPERFENILALANINEMIA - DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

Hiperfenilalaninemia (HFA) é o nome genérico dado às concentrações persistentemente elevadas de FAL no sangue quando se apresentam acima da distribuição normal, se comparados aos valores plasmáticos em indivíduos saudáveis (SCRIVER; KAUFMAN, 2001).

A HFA constitui-se numa alteração do sistema de hidroxilação da FAL e pode ser causada pela deficiência total ou parcial da enzima hepática fenilalanina- hidroxilase (FAH) ou de enzimas que sintetizam ou reduzem a coenzima tetrahidrobiopterina (BH₄) (SCRIVER; KAUFMANN, 2001).

A presença da atividade da FAH na fração solúvel dos extratos hepáticos dos mamíferos, a necessidade de oxigênio atmosférico e de NADH e a especificidade desta reação para L-fenilalanina, foram primeiramente demonstradas por Udenfriend e Cooper². A descoberta importante consecutiva, veio quando Kaufman³ identificou a estrutura da BH₄, um cofator obrigatório, e acompanhou suas transformações durante a reação de hidroxilação (TOURYAN; SIDBURY, 1978).

Podem ser encontrados diferentes tipos de hiperfenilalaninemias em consequência do local onde ocorre o erro metabólico. Este grupo heterogêneo de doenças inclui a fenilcetonúria clássica (FNC) e as variações de hiperfenilalaninemias (HPAs) que são classificadas como: HFA branda ou benigna, HFA persistente e HFA atípica (MIRA; MARQUEZ, 2000; de BAULNY *et al.*, 2007).

As diferenças quanto à capacidade de metabolizar a FAL deram origem a diversos estudos com o objetivo de classificar as suas variantes. A determinação do tipo de mutação permite estabelecer o prognóstico e o aconselhamento genético familiar adequados (CORNEJO; RAIMANN, 1999; PHOMMARINH; SCRIVER, 2007).

Burgard e cols. na tentativa de estabelecer uma base molecular para explicar a alteração metabólica, observaram uma correlação significativa entre a atividade residual da enzima FAH e os parâmetros de diagnóstico das hiperfenilalaninemias, através do isolamento do DNA complementar (DNAC) da enzima e caracterização da maioria das mutações do gene (BURGARD *et al.*, 1996).

Em estudo realizado com 123 crianças com idade até 05 anos, Güttler estabeleceu que crianças que toleram menos que 250-350mg /FAL/dia para manter a concentração de FAL sanguínea em 300mmol/L (aprox. 4,95mg/L) são classificadas como FNC clássica. Crianças que toleram 350-400mg/FAL/dia apresentam FNC moderada e as que toleram entre 400-600mg/FAL/dia, FNC branda (GÜTLER, 1980).

Segundo Cornejo e Raimann, as HFAs classificam-se de acordo com a concentração de FAL plasmática, tolerância à ingesta de FAL, atividade enzimática residual de FAH e conforme a mutação que as determinam. A definição do diagnóstico se utiliza também da relação entre os aminoácidos FAL/TIR persistentemente maior

² UDENFRIEND, S.; COOPER, J. R. The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. **Biol Chem J**, v.194, n.2, p.503-511, 1952 *apud* TOURYAN; SIDBURY, 1978.

³ KAUFMAN, S. The phenylalanine hydroxylating system from mammalian liver. **Adv Enzymol**, v.35, p.245-319, 1971 *apud* TOURYAN; SIDBURY, 1978.

que 3, sendo este parâmetro considerado de grande importância (CORNEJO; RAIMANN, 1999).

Para Cornejo e Raimann, as HFAs classificam-se em benigna, persistente, clássica e por deficiência de BH_4 . A HFA é considerada benigna quando os níveis de FAL situam-se entre 4 e 10mg/dL e os níveis de TIR são normais. Existe uma atividade da FAH em torno de 50% e os níveis de FAL podem normalizar-se por volta dos 6 meses de idade. Nestas circunstâncias a dieta é normal. Na HFA persistente, a FAL plasmática situa-se entre 4 e 19mg/dL, a TIR é normal e a atividade da FAH situa-se entre 3 e 50%. A dieta deve ser restrita para FAL em torno de 50mg/kg/dia. Na FNC clássica, os níveis de FAL plasmática estão acima de 20mg/dL e os níveis de TIR menores que 1,8mg/dL. A atividade enzimática da FAH é inferior a 1% e fenilcetonas estão presentes na urina. A ingesta de FAL deve ser menor que 20mg/kg/dia. Na deficiência da BH_4 , a concentração da FAL plasmática varia entre 4 e 8mg/dL. Os níveis de TIR podem estar normais ou ligeiramente elevados e não ocorre resposta à terapia de restrição à FAL (CORNEJO; RAIMANN, 1999).

2.3 FISIOPATOLOGIA DAS HIPERFENILALANINEMIAS

Crianças com hiperfenilalaninemia benigna, persistente ou mesmo com FNC clássica são assintomáticas ao nascer e a patologia não seria detectada precocemente se não houvesse a triagem neonatal para FNC.

2.3.1 Hiperfenilalaninemia benigna ou transitória

A atividade enzimática da FAH está acima de 3% e os níveis de FAL no sangue estão abaixo de 10mg/dL. A criança permanece em acompanhamento médico e sob monitoramento dos níveis séricos de FAL, ficando à critério do pediatra instituir ou não a dieta com restrição do aminoácido. O quadro pode vir a normalizar-se nos primeiros 6 meses de vida (CORNEJO; RAIMAN, 1999; MARTINS, 2003). Esta HFA também é denominada de não-FNC-hiperfenilalaninemia.

Economou-Petersen e cols. realizaram um estudo com 17 famílias dinamarquesas com não-FNC-HPA, as quais não faziam tratamento restritivo de FAL e sim, dieta normal. A análise dos haplótipos da FAH revelou heterozigoze em todos os indivíduos. O resultado do estudo indica que a mutação para FNC combinada com outras mutações, ou seja, dupla heterozigoze, resulta no fenótipo não-FNC HFA. Nesse caso a análise molecular contribui para identificar os pacientes não FNC e consequentemente, pode determinar se o recém-nascido tem necessidade de tratamento dietético (ECONOMOU-PETERSEN *et al.*, 1992).

Wedlage e cols estudaram 28 pacientes com não-FNC-HFA (níveis séricos de FAL abaixo de 10mg/dL) e sem tratamento, que foram submetidos a testes de avaliação psicométrica e exame de imagem de crânio. Quando comparados a um grupo controle saudável de mesma idade, sexo e nível socioeconômico, não apresentaram nenhuma anormalidade. Como não foi demonstrado nenhum resultado negativo, os autores concluíram que é improvável que o tratamento seja significativo para os pacientes não-FNC-HFA (WEGLAGE *et al.*, 1997).

2.3.2 Hiperfenilalaninemia persistente

Na HFA persistente existe uma atividade da FAH residual entre 1 e 3%, mantendo a concentração de FAL no sangue entre 10 a 20mg/dL. A concentração da TIR sérica está normal, entretanto, faz-se necessária a restrição da ingesta de FAL para reduzir os níveis séricos elevados deste aminoácido que deve ser controlado por dosagens periódicas (CORNEJO; RAIMAN, 1999; MARTINS, 2003).

2.3.3 Hiperfenilalaninemia clássica: fenilcetonúria

É uma das doenças metabólicas, entre cerca de 300, causadas por desordens nos processos bioquímicos celulares sendo o erro inato do metabolismo mais frequente em que estão envolvidos aminoácidos. É uma doença autossômica recessiva e portanto, tem um risco de recorrência de 25% a cada gestação de pais heterozigotos,

causado pela deficiência da FAH em 98% dos casos. A atividade da FAH situa-se abaixo de 1% e os níveis de FAL no sangue estão acima de 20mg/dL (THOMPSON; HALLIDAY, 1990; MIRA; MARQUEZ, 2000; MARTINS, 2003).

A reação de hidroxilação da FAL à TIR encontra-se deficiente ou ausente nos pacientes fenilcetonúricos e consequentemente, a concentração plasmática de FAL aumenta e os níveis de TIR diminuem. Para catabolizar as elevadas concentrações de FAL sérica, vias metabólicas alternativas são ativadas e os produtos desta degradação, que são habitualmente indetectáveis, passam a ter concentrações significantes na urina. São produtos desta degradação: o ácido fenilpirúvico, o ácido fenilático e o ácido fenilacético (AMORIM *et al.*, 2005). Na Figura 3 está esquematizado: à esquerda, a via metabólica secundária do metabolismo da FAL e à direita da figura, o metabolismo principal da FAL.

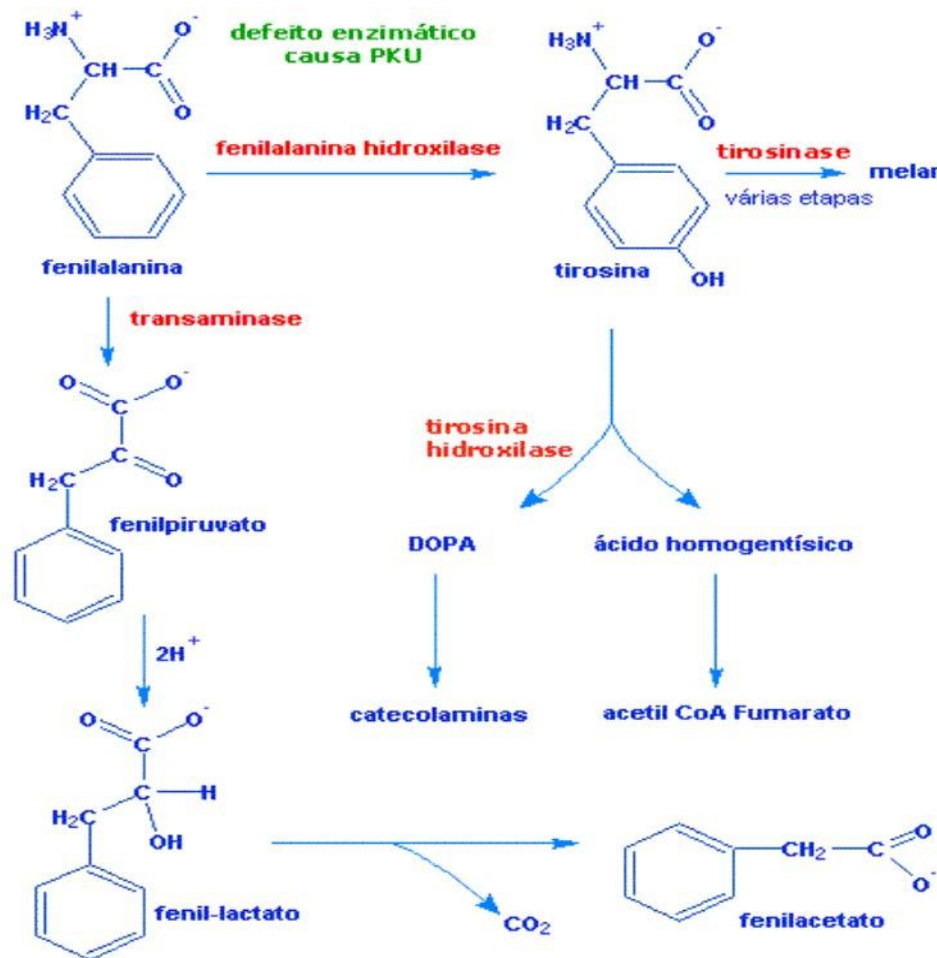


FIGURA 3 - METABOLISMO DA FENILALANINA
 FONTE: es.wikipedia.org/wiki/fenilcetonuria

Desde o advento da triagem neonatal para a FNC, raramente observa-se a evolução dos sintomas que ocorrem em pacientes não tratados.

Tem sido relatado que crianças com FNC apresentam peso mais baixo ao nascer do que as não afetadas e de idêntica idade gestacional. Também parece haver uma frequência mais elevada de dificuldades perinatais que se traduzem pela presença de vômitos frequentes na primeira infância. A persistência deste fato levou alguns recém-nascidos à cirurgia, por suspeita de estenose de piloro. Lesões eczematosas são observadas em aproximadamente 25% dos pacientes não tratados no primeiro ano de vida. Nos primeiros três meses de vida pode ser percebido um odor corporal de mofo devido ao aumento do ácido fenilacético (TOURYAN; SIDBURY, 1978; WILLIAMS; MAMOTTE; BURNETT, 2008). Esta via alternativa do metabolismo da FAL, que em condições normais é pouco importante, é ativada quando a via principal está bloqueada. Consiste na transaminação da FAL a fenilpiruvato, que sofre descarboxilação originando fenilacetato, o qual após reduzido torna-se fenil-lactato. O nome "fenilcetonúria" deriva do nome do metabólito excretado na urina dos pacientes, ou seja, o fenilpiruvato que confere um odor característico à mesma (cheiro de urina de rato) (VILARINHO *et al.*, 2006).

Durante o primeiro ano de vida existem poucos indícios específicos que possam levar o pediatra a suspeitar de FNC em seu paciente. Este é o aspecto devastador do curso clínico habitual dos pacientes não-tratados que são, geralmente, indivíduos nascidos antes da regulamentação da triagem neonatal ou em nascidos de parto domiciliar em vilarejos distantes e sem acesso à Unidades de Saúde.

Tem sido estimado que, sem tratamento, um paciente perde aproximadamente 50 pontos no coeficiente de inteligência (QI) durante o primeiro ano de vida. Evidencia-se ainda, deficiência da pigmentação de pele e cabelos causada pela deficiência de tirosina e consequente inibição da hidroxilação pela tirosinase, que é a primeira etapa do catabolismo para a formação da melanina (TOURYAN; SIDBURY 1978). Pela deficiência da tirosina e do triptofano (aminoácido aromático como a fenilalanina e que sofre inibição competitiva no sistema nervoso central), ocorre a depleção de neurotransmissores: catecolaminas e serotonina. A redução da síntese de proteínas promove a deterioração da mielina (SURTESS; BLAU, 2000; HOEKSMAN *et al.*, 2009).

Podem ocorrer episódios de dermatite pelagróide fotossensível responsiva à terapêutica com nicotinamida. A fotossensibilidade é atribuída à diluição pigmentar

secundária, à produção deficiente de melanina e possivelmente, à diminuição da absorção intestinal do triptofano que leva, também, à níveis reduzidos de nicotinamida (ANTUNES *et al.*, 1990).

As sequelas neurológicas manifestam-se por retardo mental e deficiência no desenvolvimento psicomotor com atraso no andar e na fala, convulsões; hiperatividade, transtornos de conduta, atitudes autistas e hipertonidade muscular. Com o passar dos anos a maxila torna-se proeminente com espaços interdentaes aumentados. Ocorre hipoplasia do esmalte, descalcificação dos ossos longos e redução da velocidade de crescimento. Provavelmente, 96 a 98% destes indivíduos acabam apresentando um QI inferior a 50. A maioria tem necessidade de cuidados de custódia (TOURYAN; SIDBURY, 1978).

A expectativa de vida está diminuída pela exigência da necessidade de cuidados especiais, nem sempre observados com rigor pelos cuidadores. (TOURYAN; SIDBURY, 1978; KOCH; WENZ, 1987; ERLANDSEN; STEVENS; 2001; BLOMQUIST; GUSTAVSON; HOLMGREN, 1980; CORNEJO; RAIMAN, 1999; KOCH *et al.*, 2002; HENDRIKSZ; WALTER, 2004; FEILLET, 2006; ANASTASOAE *et al.*, 2008).

Conforme relato de Cornejo, concentrações séricas de FAL menores que 10mg/dL, ou seja, HFA benigna, não produzem danos neurológicos. Porém, concentrações entre 10 e 15mg/dL são deletérias. Segundo sua experiência, devem ser tratados os pacientes que apresentem concentrações de FAL a partir de 8mg/dL se a relação FAL/TIR encontrar-se acima de 3 (CORNEJO; RAIMAN, 1999). A Figura 4 mostra o declínio do coeficiente de inteligência, no decorrer dos anos, em pacientes FCN não tratados.

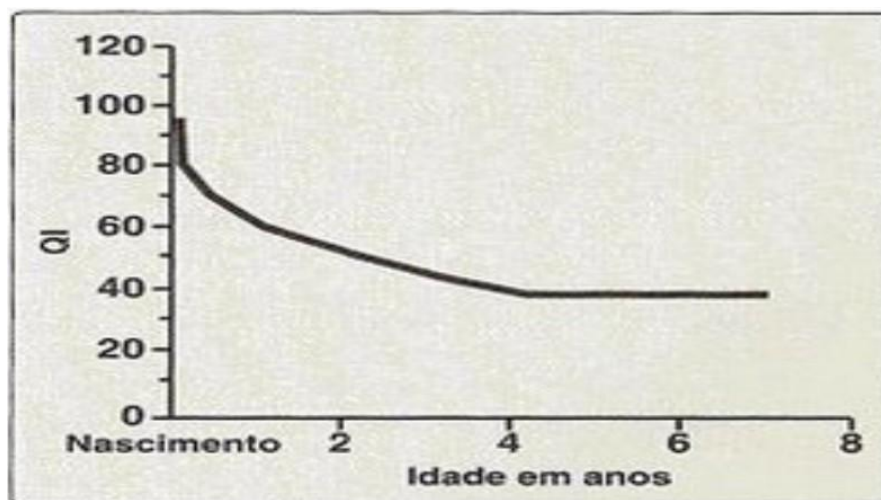


FIGURA 4 - CAPACIDADE INTELECTUAL TÍPICA EM PACIENTES FNC NÃO TRATADOS
 FONTE: pkubiobio.blogspot.com

2.3.4 Hiperfenilalaninemia não-cetonúrica ou atípica

A FNC atípica ou HFA não-fenilcetonúrica é consequência do defeito no sistema da coenzima tetrahydrobiopterina (BH_4) que atua como cofator essencial na hidroxilação da FAL. Consequentemente, a deficiência de BH_4 está associada à deficiência de neurotransmissores com quadro severo de atraso no desenvolvimento e coordenação motora (HENDRIKSZ; WALTER, 2004).

A deficiência mais frequente no sistema cofator é a da dihydropteridina redutase (DHPR) que juntamente com a pterin-4 carbinolamina desidratase recicla a BH_4 . A DHPR se encontra no cromossomo 4, região de banda p15-p16.1

As enzimas que produzem a BH_4 são: guanossina-trifosfato-ciclohidrolase (GTPCH 1) localizada no cromossomo 14, região de banda q11, 6-piruvoyltetrahydropterina-sintetase (PTPS) que ainda não está mapeada e a sepiapterina-redutase, igualmente não mapeada (CORNEJO; RAIMAN, 1999; THÖNY; AUERBACH; BLAU, 2000; BLAU; AWARD, 2001). Portanto, a BH_4 forma-se quer a partir da GTP, quer pela reciclagem da BH_2 , através da enzima DHPR. A deficiência em qualquer um desses passos pode resultar em um aumento da concentração de FAL no sangue que conduz a uma FNC com quadro neurológico, mais grave, denominada FNC maligna ou atípica (VILARINHO *et al.*, 2006).

Os sintomas podem manifestar-se durante as primeiras semanas de vida, mas usualmente são percebidos por volta dos quatro meses de idade. O recém-nascido apresenta-se agitado, exceto se for bastante prematuro ou de muito baixo peso.

A deficiência de BH_4 não é rotineiramente identificada pela triagem neonatal, porém, seria ideal que todo o recém-nascido que apresente níveis ligeiramente elevados de FAL fossem investigados quanto à concentração dos metabólitos de neurotransmissores e pterinas. Esta conduta deveria estender-se às crianças maiores que apresentem sinais e sintomas neurológicos (BLAU *et al.*, 2005; JÄGGI *et al.*, 2008).

Por erro de diagnóstico, crianças com deficiência da BH_4 podem ser tratadas como fenilcetonúricas. Vários grupos de pesquisadores relatam que o tratamento inadequado favorece, pela expectativa de resposta e tempo decorrido, o agravamento do quadro neurológico e do retardo mental. A dieta com restrição de FAL não reverte os efeitos deletérios no sistema nervoso central e, consequente, a deficiência de neurotransmissores não é corrigida. O diagnóstico é baseado na baixa razão biopterina/

neopterina na urina, na medição dos níveis séricos de biopterina, na medição da atividade da DHPR no sangue e na análise de neurotransmissores específicos no líquido cefalorraquidiano (HENDRIKSZ; WALTER, 2004).

2.4 FENILCETONÚRIA MATERNA

Elevada concentração de FAL sérica em mãe fenilcetonúrica (FNC) produz uma síndrome clínica característica no feto. A hipótese levantada e confirmada em vários estudos é de que altas concentrações de FAL materna provocam inibição no transporte competitivo de outros aminoácidos aromáticos, como o triptofano e a tirosina, para o interior da placenta. Isto acarreta a deficiência destas moléculas que atuam no sistema nervoso central do feto em formação.

A FAL materna em excesso, atravessa a barreira placentária atingindo concentrações de 1,2 a 1,9 vezes mais elevadas que no sangue materno. O sistema hepático imaturo do concepto tem dificuldade em metabolizar concentrações elevadas de FAL resultando em hiperfenilalaninemia, com ação lesiva sobre o feto. Este efeito se evidencia sobretudo no cérebro, onde são demonstradas alterações de mielinização por deficiência da síntese protéica de neurotransmissores. O metabolismo anômalo resulta no desenvolvimento da síndrome FNC materna no feto (GÜTTLER *et al.*, 2003; FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2004).

Segundo Lenke e Levy ⁴ 92% dos filhos de gestante com FNC não tratada apresentaram retardo mental, 73% microcefalia, 12% malformações cardíacas congênitas e 40%, baixo peso ao nascer, ou seja, menos de 2,5kg. A microcefalia geralmente é acompanhada de anormalidades faciais características: face arredondada, fissuras palpebrais amplas, palato em ogiva e estrabismo, entre outras. Ocorrem abortos espontâneos em 24% das gestações de mães FNC (KOWALSKA, 1986; LEVY *et al.*, 2001).

Dentre as malformações congênitas, as cardíacas são as mais comuns, como a tetralogia de Fallot. Segundo Matalon e Michals, a partir do *Maternal Phenylketonuria Collaborative Study*, foi demonstrada a proporção de 7,5% de doenças cardíacas em

⁴ LENKE, R. R.; LEVY, H. L. Maternal phenylalanine and hyperphenylalaninemia. **N England J Med**, v.303, p.1202-1208, 1980 *apud* KOWALSKA, 1986.

mães com FAL acima de 10mg/dL durante as primeiras oito semanas de gestação (MATALON; MICHALS, 1991; ROUSE *et al.*, 2000; KOCH *et al.*, 2002; FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2004).

É imprescindível que a mulher fenilcetonúrica, se não estiver adotando uma dieta rigorosa com baixa ingestão de FAL e que tenha a intenção de engravidar, a inicie alguns meses antes da concepção. As principais causas secundárias da elevação da FAL no recém-nascido incluem: prematuridade, doença renal ou hepática e o uso de medicações como trimetropim ou agentes quimioterápicos (SOUZA, 2002).

2.5 TRATAMENTO DA FENILCETONÚRIA

O tratamento da FNC consiste em uma dieta que ofereça alimentos com baixo teor de fenilalanina, mas em quantidade suficiente de forma a evitar uma síndrome carencial, pois a FAL é um aminoácido essencial. O aporte proteico não pode ser atingido com alimentos naturais sem que haja ingestão excessiva de fenilalanina. Proteínas naturais podem conter de 2,4 a 9% deste aminoácido. A dieta deve ser suplementada com produtos especiais denominados de "*medical foods*" (fórmulas metabólicas) que consistem em compostos de aminoácidos isentos ou com baixo teor de fenilalanina. A fórmula deve ser oferecida ao paciente, distribuída nas 24h do dia. O tratamento deve ser monitorado periodicamente, por acompanhamento clínico, dosagens bioquímicas de FAL e avaliação nutricional observando-se, principalmente, as mudanças fisiológicas e fisiopatológicas que alteram os valores séricos de fenilalanina do paciente (MARQUES, 1996; MONTEIRO; CÂNDIDO, 2005; CEARÁ, 2006).

Especial atenção deve ser dada ao aporte do aminoácido tirosina (TIR). A TIR está incorporada em todas as proteínas e é, como já descrito, um precursor da tiroxina, melanina e dos neurotransmissores: dopamina e norepinefrina. Em pessoas normais a razão fenilalanina/tirosina é de 1:1. Uma vez que, os indivíduos fenilcetonúricos não conseguem sintetizar TIR a partir da FAL, passam a necessitar de fontes proteicas que forneçam cerca de dez vezes mais TIR do que as proteínas normais. Para estes indivíduos, a TIR torna-se um aminoácido essencial (MATALON; MICHALS, 1991).

No Brasil estão disponíveis fórmulas de aminoácidos das marcas PKU[®] e RILLA[®]. A marca PKU[®] é industrializada pela *Support*[®], empresa alemã, e a marca RILLA[®] é industrializada por empresa brasileira sediada em São Paulo.

O complemento alimentar para fenilcetonúricos também está à venda no mercado, em alguns Estados. As formulações são adequadas ao aporte de proteína requerido nas diferentes faixas etárias e variam conforme o peso corporal e a tolerância de cada indivíduo (CEARÁ, 2006).

As crianças fenilcetonúricas do Estado do Paraná recebem a fórmula especial para FCN gratuitamente durante o 1.º ano de vida. através da Associação dos Fenilcetonúricos e Homocistinúricos (AFEH), O governo do Paraná efetua a compra por licitação (BRANDALIZE, 2002).

Segundo Mitchell e Scriver é recomendado, na infância, uma ingesta total de aminoácidos com restrição de FAL de pelo menos 3g/kg/dia, incluindo 25mg/kg/dia de TIR. A concentração de FAL no sangue deverá ser monitorada semanalmente ou quinzenalmente. Crianças a partir de dois anos de idade devem receber 2g/kg/dia de aminoácidos com restrição de FAL e 25mg de TIR/kg/dia. O monitoramento até os sete anos de idade deve ser quinzenal e após mensal. As recomendações quanto à dietoterapia para adolescentes, a partir de doze anos de idade e adultos, são mais flexíveis. Estudos demonstram que a descontinuidade parcial da dieta não altera as funções cognitivas e motoras. Entretanto, o abandono diminui estas habilidades (MITCHELL; SCRIVER, 2007).

Conforme protocolo da Secretaria do Estado da Saúde do Ceará, as concentrações de FAL aceitáveis para os pacientes em tratamento, ainda são motivo de discussão na literatura. Porém, há um consenso de que o controle deve ser muito rigoroso nos primeiros três anos de vida, quando se deve manter valores fisiológicos normais entre 3 e 4mg/dL de FAL. Até aos doze anos de idade, 6mg/dL de FAL e, abaixo de 10mg/dL, durante os anos subsequentes ao tratamento. A interrupção do tratamento pode ser tentada nos casos de hiperfenilalaninemia entre 10-20mg/dL, mas nunca nos casos acima de 20mg/dL. A avaliação clínica da resposta terapêutica deve tomar como parâmetro, a concentração sérica normal de FAL e o estado nutricional adequado do paciente (CEARÁ, 2006).

No *Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA)*, Chile, tem sido testada, desde a década de 90, a alimentação mista com fórmula hidrolisada e com leite materno. Esta experiência de tratamento em crianças fenilcetonúricas tem

trazido resultados excelentes. A prática da amamentação além de permitir o crescimento normal do recém-nascido e favorecer a relação afetiva mãe e filho, fortalece a aderência à dieta e diminui o custo do tratamento durante os primeiros meses de vida (CORNEJO; RAIMAN, 1999).

Experiência semelhante foi realizada em Curitiba, quando foi introduzido o aleitamento materno em uma criança do sexo feminino, nascida em 2008 e procedente de Araucária (Região Metropolitana de Curitiba). A amamentação foi precedida pela ingesta da fórmula especial. Esta criança foi acompanhada e orientada por uma equipe multidisciplinar envolvendo o ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do HC e a FEPE. Este experimento mostrou, conforme o quadro apresentado no Anexo 6, resultados dentro dos parâmetros esperados para os valores de FAL. Os resultados foram obtidos através de dosagens bioquímicas semanais da concentração de FAL no sangue.

Em estudo recente de Kanufre e cols., Minas Gerais, foram igualmente ressaltadas as vantagens do aleitamento materno conjunto, pois promove o crescimento e o controle das concentrações de FAL adequados em crianças FNC (KANUFRE *et al.*, 2007).

A principal restrição alimentar para pacientes fenilcetonúricos envolve, devido ao alto teor de FAL, os alimentos de origem animal. Entretanto, cereais, frutas e verduras devem ser cuidadosamente controlados conhecendo-se a concentração deste aminoácido nestes alimentos (CORNEJO; RAIMAN, 1999).

A baixa ingestão de proteínas de alto valor biológico e a predominância de alimentos de origem vegetal contendo fibras, fitatos, oxalatos e taninos, repercute diretamente na redução da biodisponibilidade de nutrientes como ferro, zinco, cálcio, selênio, vitaminas A, complexo B, vitamina D, entre outros.

Verificou-se que a concentração individual de cada aminoácido em misturas formuladas, nem sempre está de acordo com as recomendações de ingestão estabelecidas pela FAO/WHO. Krauch e cols. avaliaram a composição de algumas misturas de aminoácidos sintéticos isentas de FAL e verificaram que a ingesta sugerida fornecia quantidade de aminoácidos essenciais inferiores às recomendadas pelos órgãos competentes, em se tratando de bebês de três a dez meses de idade. Nas formulações para crianças com três anos de idade, os aminoácidos: valina, isoleucina e lisina estavam presentes em concentrações duas a três vezes acima do que era considerado ideal. Para crianças com idade de oito a doze anos, os mesmos

aminoácidos (valina, isoleucina e lisina) excederam em 217%, 229% e 291% respectivamente, às recomendações da FAO/WHO (KRAUCH *et al.*, 1996).

No Brasil há alguns trabalhos em pesquisa de hidrolisados de proteínas com baixo de teor de FAL.

Lara (2005) desenvolveu um trabalho utilizando soro de leite bovino submetido à ação da pancreatina, obtendo a liberação dos aminoácidos aromáticos: 74% de FAL, 100% de TIR e 100% de triptofano (LARA, 2005).

Trabalho semelhante foi desenvolvido por Silva e cols em 2005, empregando pancreatina imobilizada na extração de soro de leite que produziu um hidrolisado com teor reduzido de FAL (SILVA *et al.*, 2005).

Capobiango em 2006, em sua dissertação de Mestrado, apresentou a obtenção de um hidrolisado com concentração baixa de FAL a partir de proteínas do fubá de milho (CAPOBIANGO, 2006).

O tratamento dietoterápico para a FNC é complexo, de longa duração e requer muitas mudanças nas ações por parte do paciente e de sua família. O sucesso do tratamento, como em qualquer doença crônica, depende da disponibilidade do paciente em seguir as recomendações médicas prescritas (CORNEJO; RAIMAN, 1999).

2.6 TRATAMENTO DA FENILCETONÚRIA ATÍPICA

A FNC não cetonúrica ou atípica ocorre, como já descrito anteriormente, por deficiência de uma das enzimas do sistema cofator BH₄, em cerca de 2% dos casos de FNC, sendo a deficiência da dihidrobiopterina redutase (DHPR) a mais frequente. (CORNEJO; RAIMANN, 1999).

Como a concentração plasmática de FAL não é responsiva ao tratamento dietoterápico e, concomitantemente a este tipo de tratamento a deterioração neurológica continua evoluindo, a deficiência de BH₄ também é chamada de FNC maligna.

Faz-se necessária a sua rápida identificação para que o tratamento correto seja iniciado para restaurar o equilíbrio do sistema neurotransmissor. O tratamento constitui-se na administração, via oral, de precursores da dopamina e da serotonina, ou seja, L-Dopa e 5-hidroxitriptofano respectivamente, juntamente com ácido folínico (HENDRIKSZ; WALTER, 2004; LEVY *et al.*, 2007; JÄGGI *et al.*, 2008).

2.7 TRATAMENTOS ALTERNATIVOS DA FNC

A dificuldade no seguimento nutricional adequado tem estimulado pesquisas que visam ao desenvolvimento de tratamentos alternativos que estão em fase de estudo.

2.7.1 Suplementação com aminoácidos neutros

A fenilalanina tal como outros aminoácidos neutros: asparagina, cisteína; glutamina; histidina; isoleucina; leucina; metionina; serina; treonina; tirosina; triptofano; e valina, passa a barreira hematoencefálica através de transportadores de aminoácidos do tipo L.

Elevados níveis de fenilalanina, como os habitualmente observados nos indivíduos fenilcetonúricos, competem com o transporte de outros aminoácidos neutros para o cérebro, como já descrito. Alguns destes, como a tirosina e o triptofano, são precursores de catecolaminas e neurotransmissores, respectivamente. Está comprovado que a síntese deficiente de neurotransmissores é um fator que contribui para a disfunção cognitiva observada na FNC (MATALON *et al.*, 2003).

Consequentemente, uma nova estratégia terapêutica baseada na ingestão protéica moderada e combinada com suplementos de aminoácidos neutros, isentos de fenilalanina, foi introduzida. Esta estratégia foi apresentada em 1985, à adolescentes e adultos fenilcetonúricos com dificuldades em aderir à dieta com restrição de FAL. Apesar da grande quantidade de suplementos que os doentes têm de consumir (cerca de dez tabletes antes de cada refeição), este tipo de terapêutica tem tido uma boa aceitação e tem demonstrado não haver diferenças no desenvolvimento cognitivo ou efeitos adversos em adolescentes sob a dieta convencional, quando comparados com adolescentes submetidos à uma dieta menos restritiva, em termos proteicos, com suplementos de aminoácidos neutros isentos de fenilalanina (SANTOS *et al.*, 2006).

Concluiu-se que os aminoácidos neutros podem ser utilizados como suplemento do tratamento dietético convencional da fenilcetonúria e podem permitir uma dieta mais liberal ou promover uma maior concordância com a mesma (MATALON *et al.*, 2003).

Entretanto, maiores estudos clínicos são necessários para validar a efetividade deste tipo de tratamento (HENDRIKSZ; WALTER, 2004; MITCHELL; SCRIVER, 2007).

2.7.2 Suplementação com BH₄

A suplementação com BH₄ tem-se mostrado uma alternativa eficaz à dieta com restrição de fenilalanina. Diversos estudos demonstraram concentrações reduzidas de FAL plasmática após a administração oral de suplementos de tetrahydrobiopterina (BH₄). Nestes casos, o metabolismo do cofactor era normal, contudo, a adição de BH₄, em grande quantidade, normalizou o nível plasmático de fenilalanina (MATALON, 2001; BERNEGGER; BLAU, 2002; FIEGE; BLAU, 2007).

Alguns argumentos têm sido propostos para explicar a resposta à tetrahydrobiopterina: o aumento da afinidade de ligação da fenilalanina-hidroxilase mutante pela tetrahydrobiopterina; a proteção do tetrâmero ativo contra a degradação; o aumento da biossíntese da tetrahydrobiopterina e a regulação da expressão da fenilalanina-hidroxilase (SANTOS *et al.*, 2006). O fator mais importante que determina a conformidade da terapia com o cofator parece ser a combinação alélica no locus do gene da FAH e a intensidade da resposta à tetrahydrobiopterina. O teste de sobrecarga com tetrahydrobiopterina deveria ser efetuado rotineiramente nos recém-nascidos com hiperfenilalaninemia para excluir a deficiência do cofator (ERLANDSEN; STEVENS, 2001).

Levy e cols. demonstraram que uma variedade de mutações está relacionada com uma resposta favorável à administração oral de tetrahydrobiopterina (LEVY *et al.*, 2007).

Alguns doentes com hiperfenilalaninemia não-fenilcetonúrica e fenilcetonúria clássica, moderada ou branda, respondem à elevadas doses de tetrahydrobiopterina. No entanto, o tratamento é mais eficaz nas formas mais suaves da doença. Nestes doentes está excluída a deficiência de tetrahydrobiopterina (MUNTAU *et al.*, 2002).

A maior desvantagem do uso do cofator no tratamento da fenilcetonúria é o elevado custo (LEVY *et al.*, 2007). Somando-se à isto, acrescenta-se a escassez de estudos que demonstrem a eficácia, a longo prazo, do tratamento com tetrahidrobiopterina e o fato deste não ser adequado para todos os doentes (ERLANDSEN; STEVENS, 2001; MUNTAU *et al.*, 2002; THÖNY; DING; MARTINES, 2004; MULTANOWSKI *et al.*, 2008).

2.7.3 Terapia enzimática com fenilalanina amônia-liase

Outros estudos para o tratamento da fenilcetonúria envolvem a administração oral de fenilalanina amônia-liase. Trata-se de uma enzima que atua degradando a fenilalanina no lúmen intestinal evitando a sua absorção. Problemas associados à este tratamento envolvem a inativação da fenilalanina amônia-liase pelas enzimas digestivas do paciente, além dos elevados custos na sua purificação. Em seres humanos, esta enzima alternativa foi testada apenas na forma purificada (MATALON *et al.*, 2003; BLAU *et al.*, 2005). Para evitar a inativação, ela deve ser imobilizada em microcápsulas semipermeáveis, o que dificulta a sua destruição pelas enzimas digestivas do paciente. Com esta preparação verificou-se a redução das concentrações plasmáticas de fenilalanina em cobaias e humanos. Quando injetada intravenosamente, a fenilalanina amônia-liase exibe baixa estabilidade e elevada imunogenicidade (SANTOS *et al.*, 2006).

Alguns estudos sugerem que o tratamento da FNC requer maior redução nas concentrações de fenilalanina plasmática do que a obtida com este tratamento. Outro ponto negativo deve-se ao fato de que a fenilalanina amônia-liase não origina a produção de tirosina (LEVY *et al.*, 2007; BLAU *et al.*, 2005; SARKISSIAN; GÀMEZ, 2005).

2.7.4 Terapia gênica

A terapia gênica para a FNC (ainda em fase experimental) oferece grande expectativa para o futuro. Trata-se de uma técnica que atua modificando a expressão

de genes individuais ou corrigindo genes anormais, através da administração de ácido desoxirribonucleico (DNA) (DING; HARDING; THÖNY, 2003; BLAU *et al.*, 2005).

Existem 3 estratégias diferentes para a terapia gênica: a de substituição, a de correção e a de aumento de genes. Na substituição de genes o gene mutado é removido e substituído por um gene normal. Na técnica correção, apenas a zona afetada do gene mutado é corrigida. E na técnica de aumento de genes, ocorre a introdução de material genético estranho à célula com a finalidade de recuperar a função do gene mutado. O material genético estranho pode ser introduzido nas células afetadas por meio de adenovírus ou de retrovírus. As células que recebem o gene irão conter tanto o gene mutado como o gene exógeno. Esta última estratégia de terapia gênica é a que está sendo melhor estudada para o tratamento da FNC.

Têm sido experimentados diferentes veículos de transferência do gene codificante da fenilalanina hidroxilase em cobaias. Podem ser vetores não-virais, vetores adenovirais recombinantes, vetores retrovirais recombinantes e vetores associados a adenovírus recombinantes (HENDRIKSZ; WALTER, 2004).

Estudos mostraram que vetores derivados de um retrovírus recombinante permitem a transferência gênica eficiente de hepatócitos com o DNAC (DNA complementar) codificante da fenilalanina hidroxilase *in vitro*. Contudo, a transferência *in vivo* é pouco eficiente (SANTOS *et al.*, 2006).

Foram também realizados estudos utilizando vetores derivados de um adenovírus recombinante expressando o DNAC da fenilalanina-hidroxilase. Estes vetores foram inseridos na circulação portal de cobaias com deficiência em FAH. Houve a recuperação de grande parte da atividade da fenilalanina-hidroxilase hepática normalizando os níveis plasmáticos de fenilalanina. A produção de anticorpos contra o vetor adenoviral recombinante, por parte do paciente, tem sido um grande obstáculo a esta estratégia. Entretanto, verifica-se que a administração de um imunossupressor pode impedir a resposta imune do hospedeiro prolongando a expressão do gene codificante da FAH e reduzindo a falta de pigmentação (ZHAOBING; HARDING; THÖNY, 2004; HARDING, 2008). A utilização de vetores associados a adenovírus recombinantes parece mais segura e mais eficaz, pois estes induzem uma mínima resposta imune e conduzem a efeitos terapêuticos mais prolongados. O tratamento se mostrou satisfatório em ratos fenilcetonúricos machos, com redução dos níveis plasmáticos de fenilalanina em pouco tempo. Inesperadamente o tratamento foi menos eficaz em fêmeas, sendo necessários mais estudos para explicar esta diferença.

Além da terapia gênica convencional, alguns estudos com terapia heteróloga, expressão da fenilalanina-hidroxilase em outros tecidos que não o fígado, têm sido desenvolvidos para tratamento da FNC (MATALON, 2001).

2.8 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA FNC

A FNC ocorre em todos os grupos étnicos devido à grande variabilidade genética. A prevalência em recém-nascidos pode variar de 1:2.600 até 1:30.000, sendo a média mundial de 1:10.000. É mais frequente em caucasianos e menos frequente em judeus Askenazi. Na Finlândia a FNC praticamente não existe, na Islândia há uma incidência de 1:6.000 e no Japão, 1:60.000 (MONTEIRO; CÂNDIDO, 2005).

Na Europa Ocidental, a incidência da doença é em média 1:8.000. recém-nascidos, apesar de grandes diferenças entre os vários países. Nos Países-Baixos, a incidência calculada é de 1:18.000. No Reino Unido é de 1:10.000 e na Irlanda é de 1:4.000 nascidos vivos. No centro da Espanha é de 1:7.000, na região da Cantábria e Castilha de Leon é de 1:13.000 e na região da Galícia é de 1:25.254. Na Áustria, o programa de proteção para recém-nascidos com erros inatos de metabolismo registrou, no período de março de 1966 a setembro de 1994 307 casos, entre os quais, 249 eram de FNC, resultando numa incidência de 1:9.620 recém-natos. Os outros 58 casos eram de HFA mostrando uma incidência 1:41.000. Na Turquia, devido à alta consanguinidade, a incidência é de 1:6.000 recém-nascidos e no Chile a incidência é de 1:14.000. A incidência da FNC também pode sofrer variações geográficas dentro de um mesmo país. Na Hungria, país com 10 milhões de habitantes e no qual existem dois centros para FNC, foram registrados pelo Centro de proteção à crianças com FNC em Budapeste e durante o período de 1975 a 1994, 160 casos de FNC clássica, o que corresponde a uma incidência de 1:9.000 entre um total de 1,5 milhões de recém-nascidos (CORNEJO; RAIMANN, 1999).

Cabalska e cols. observaram que a ocorrência de FNC clássica na população da Polônia é de 1:8.000, enquanto que para HFA é de 1:40.000 (CABALSKA *et al.*, 1996).

No Brasil, segundo Jardim e cols., a prevalência da FNC é de 1:12.000 a 1:15.000 recém-nascidos (JARDIM *et al.*, 1996). Segundo o levantamento da Sociedade Brasileira de Triagem Neonatal (SBTN) apresentado em novembro de 2001 durante o

1.º Congresso Brasileiro de Triagem Neonatal em Curitiba, Paraná, a prevalência da FNC é de 1:15.500 nascidos vivos. Entretanto, não se tem conhecimento de todos os casos devido a inexistência de controle em algumas regiões do país e ao pouco tempo da obrigatoriedade do teste para a detecção da doença (CARVALHO, 2003; CARVALHO; VARGAS; SANTOS, 2003). No Estado do Paraná, a prevalência da FNC está em torno de 1:24.000 recém-nascidos triados (dados da FEPE - 2011).

A frequência da FNC é mais elevada na população caucasiana (brancos) em relação às demais etnias como demonstrado na Figura 5.

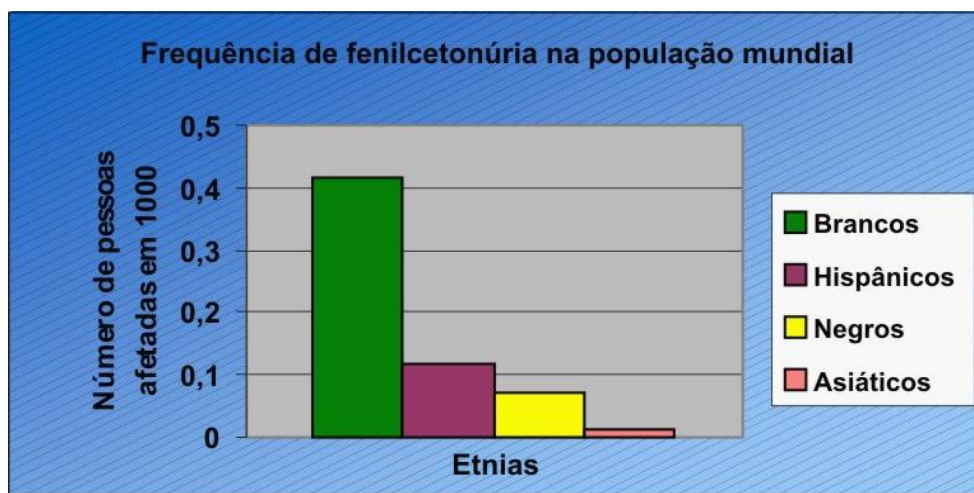


FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO ÉTNICA DA FNC
 FONTE: www.ufv.br/dbg/bio240/dg14.htm

2.9 ERROS INATOS DO METABOLISMO (EIM)

Os erros inatos do metabolismo (EIM) caracterizam-se por envolver moléculas de pequeno tamanho que circulam em quase todos os compartimentos corporais, originárias do metabolismo intermediário. As manifestações clínicas tendem a se evidenciar na vida extrauterina com a perda da função dialisadora da placenta materna e podem ser desencadeadas por fatores exógenos (BICKEL, 1987; SAUDUBRAY; CHARPENTIER, 1995; MARTINS, 2003; EL HUSNY; DERNANDES-CALDATO, 2006).

Estes erros resultam da falta de atividade de uma ou mais enzimas específicas ou por defeitos no transporte de proteínas, tendo como consequência o acúmulo de substâncias normalmente presentes no sangue em pequenas quantidades. São causados, na sua grande maioria, por herança autossômica recessiva, ou seja, tem

um risco de recorrência de 25% a cada gestação de pais heterozigotos. Algumas doenças ocorrem por herança ligada ao X apresentando um risco de recorrência a cada gestação, de 50% para o sexo masculino e de 50% para o sexo feminino, como portador. Para as doenças mitocondriais determinadas por mutações do ácido desoxirribonucléico (DNA mitocondrial), o risco de recorrência é de praticamente 100% nos filhos de ambos os sexos quando a mãe é a portadora da mutação (MARTINS, 2003).

O desenho esquemático da Figura 6 (heredograma) exemplifica a herança genética autossômica recessiva.

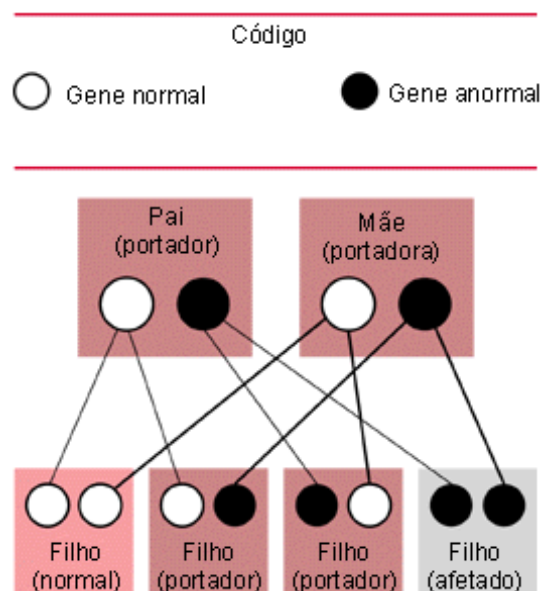


FIGURA 6 - DESENHO ESQUEMÁTICO DE HERANÇA AUTOSSÔMICA RECESSIVA

FONTE: Manual Merck Saúde para a Família
(http://mmspf.msdonline.com.br/pacientes/manual_merck/secao_01/cap_002.html)

Os EIM individualmente são considerados raros, mas a incidência cumulativa, quando considerados juntos, é de 1:5.000 recém-nascidos vivos. Como têm apresentação clínica bastante inespecíficas, é comum o pediatra cogitá-las tardiamente. A demora no diagnóstico e tratamento podem trazer danos irreparáveis à saúde da criança, comprometendo a qualidade de vida na fase adulta. Por outro lado, sabe-se que o esforço na detecção e a intervenção precoce são recompensados por uma evolução clínica favorável e pela prevenção de novos afetados (JARDIM *et al.*, 1996; MARTINS, 2003).

De acordo com Saudubray e Charpentier (1995), os EIM classificam-se em três grandes grupos:

- Grupo I - quando apresentam defeito de síntese ou catabolismo de moléculas complexas: doenças lisossomais e peroxissomais;
- Grupo II - quando apresentam defeito no metabolismo intermediário: aminoacidopatias, acidúrias orgânicas, defeitos do ciclo da ureia e intolerância aos açúcares;
- Grupo III - quando apresentam defeito na produção ou utilização de energia: doenças de depósito de glicogênio, defeitos da β -oxidação dos ácidos graxos, doenças mitocondriais e hiperlactemias congênitas (SAUDUBRAY; CHARPENTIER, 1995; MARTINS, 2003).

Segundo Bickel, as doenças metabólicas tornam-se clinicamente importantes se elas não são tão raras, o que é confirmado atualmente com o advento de métodos diagnósticos que possuem maior sensibilidade e especificidade e se existe uma terapia efetiva (BICKEL, 1987).

2.10 MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA FISIOPATOLOGIA DA FENILCETONÚRIA: FENILALANINA, TIROSINA, FENILALANINA-HIDROXILASE E TETRAHIDROBIOPTERINA

2.10.1 Fenilalanina (FAL)

A FAL é uma das 20 subunidades monoméricas chamadas de aminoácidos que compõe a estrutura de milhares de diferentes proteínas dos seres vivos, desde as formas mais simples de vida, como as bactérias, até as formas mais complexas. Aproximadamente 500 tipos de aminoácidos foram descobertos na natureza. No entanto, somente 20 atuam como constituintes das proteínas orgânicas que, rearranjando-se em combinações complexas, resultam em mais de 100 mil tipos de proteínas. Todos os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas têm um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono (carbono α). O que os difere são suas cadeias laterais, ou grupos "R", que variam de estrutura, tamanho

e carga elétrica, influenciando na solubilidade em água quando em pH fisiológico. Portanto, por conta dos grupos "R", os aminoácidos apresentam propriedades químicas diferenciadas. A FAL possui cadeia lateral aromática conferindo-lhe característica não polar ou não hidrofóbica. Não sendo sintetizada pelo organismo, precisa ser absorvida da dieta, o que lhe confere a classificação de aminoácido essencial (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

A proporção de FAL utilizada para a síntese de proteínas varia com a idade situando-se em torno de 50% da ingestão diária durante a fase inicial do crescimento e diminuindo à medida que a velocidade de crescimento diminui.

Como já descrito, fisiologicamente a via mais significativa da degradação do excesso da FAL não utilizada para o anabolismo proteico, ocorre no fígado, pela enzima fenilalanina-hidroxilase (FAH) (TOURYAN; SIDBURY, 1978). A molécula de fenilalanina nas suas formas espacial e estrutural está exemplificada na Figura 7.

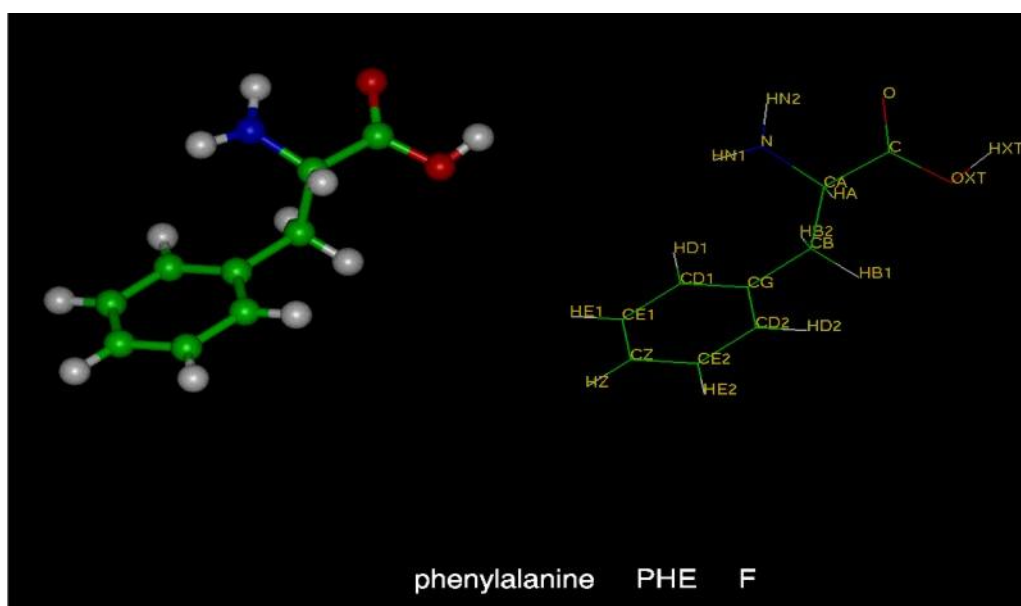


FIGURA 7 - MOLÉCULA DE FENILALANINA (FAL)
FONTE: www.icb.ufmg.br/.../grupos/grupo4/principal.html

2.10.2 Tirosina (TIR)

A TIR é um aminoácido essencial para a síntese protéica nos tecidos dos mamíferos. Atua como precursora das catecolaminas: dopamina e noradrenalina e

como substrato para a síntese de tiroxina e de melanina (TOURYAN; SIDBURY, 1978). A TIR está demonstrada, nas formas espacial e estrutural, na Figura 8.

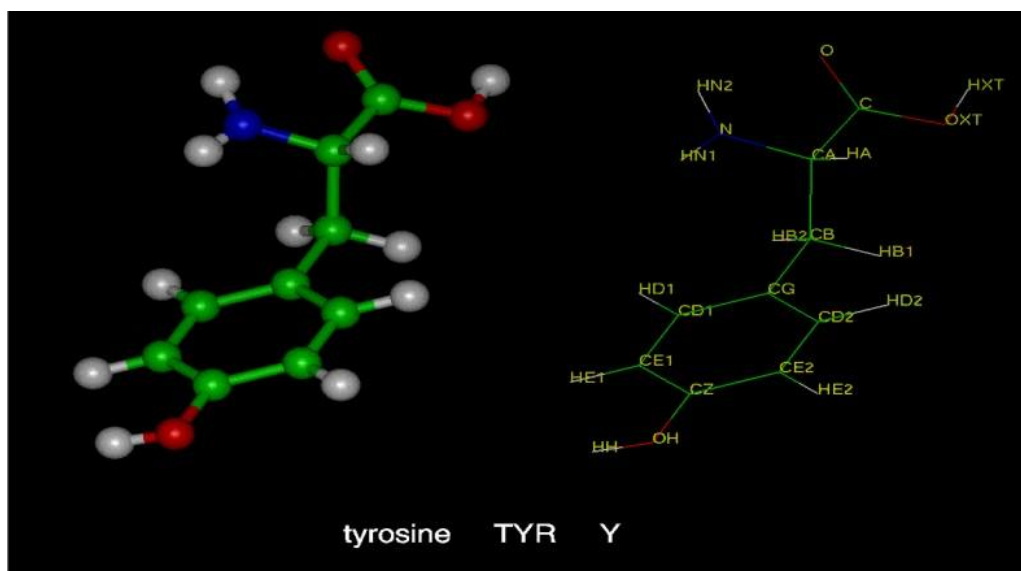


FIGURA 8 - MOLÉCULA DE TIROSINA (TIR)
FONTE: www.icb.ufmg.br/.../grupos/grupo4/principal.html

2.10.3 Fenilalanina-hidroxilase (FAH)

A enzima fenilalanina-hidroxilase (FAH) cataliza a conversão de L fenilalanina para L tirosina e é a via mais importante para o catabolismo de cerca de 75% da FAL assimilada pela dieta.

Desde a descoberta da relação entre a FAL e as mutações da FAH, esta enzima tem sido objeto de intensos estudos bioquímicos e genéticos. Entretanto, houve dificuldade, por muitos anos, de se entender detalhadamente a sua estrutura (FUSETTI *et al.*, 1998).

A FAH é uma enzima com estrutura quaternária constituída por um tetrâmero. Cada unidade polipeptídica está ligada a um átomo de ferro, cuja função é fixar o oxigênio. A molécula da FAH é regulada por fosforilação e desfosforilação. Possui três regiões funcionais: a região reguladora responsável pela ligação à fenilalanina; a região catalisadora que promove a hidroxilação da fenilalanina e uma região de tetramerização das cadeias polipeptídicas.

A reação de hidroxilação da FAL à TIR pela FAH tem a participação do cofator tetrahydrobiopterina (BH_4). Quando a TIR é formada, a BH_4 é oxidada à dihydropteridina quinase (BH_2) e após, é reciclada a BH_4 novamente, pela dihydropteridina redutase (DHPR). Assim, a coenzima BH_4 torna-se apta para ativar a FAH de novo. Para que ocorra a reação de hidroxilação da FAL é necessária a presença de oxigênio molecular (ERLANDSEN; RAYMOND; STEVENS, 1999). A molécula da fenilalanina-hidroxilase está apresentada na Figura 9.

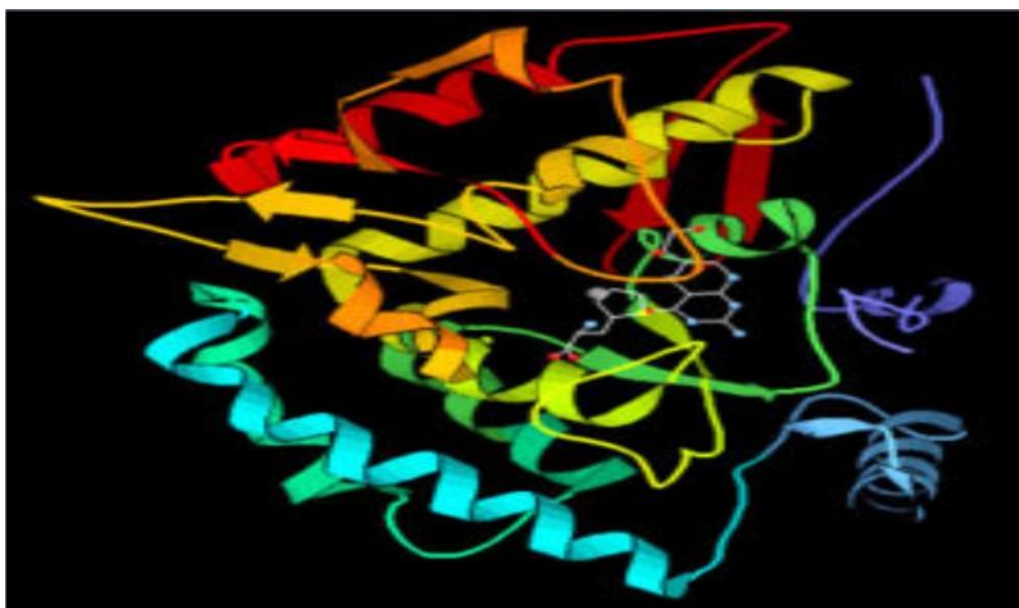


FIGURA 9 - FENILALANINA HIDROXILASE (FAH) - FIGURA ESPACIAL
FONTE: www.pt.wikipedia.org/wiki/fenilalanina_hidroxilase

2.10.3.1 Gene da fenilalanina-hidroxilase

A FNC exibe uma grande variabilidade genética e até o momento foram identificadas 528 mutações diferentes localizadas no gene codificante da FAH, as quais são responsáveis por defeitos na atividade da enzima em diferentes graus de gravidade (PHOMMARINH; SCRIVER, 2007).

Este gene está localizado entre as bandas 2 e 4 no braço longo do cromossomo 12 (12q22-q24.1) e contém uma sequência nucleotídica conhecida de 90Kb. Contém 13 exons que codificam um RNA mensageiro de 2,4Kb e uma complexa região de elementos regulatórios. É um gene rico em marcadores intragênicos polimórficos, incluindo fragmentos de restrição bialélicas ao longo dessa sequência e

em alelos de nucleotídeos isolados (LIDKSY *et al.*, 1984; ERLANDSEN; RAYMOND; STEVENS, 1999; ERLANDSEN *et al.*, 2003; PHOMMARINH; SCRIVER, 2007).

Estas mutações podem ocorrer por: deleções de parte do gene, inserções de bases adicionais, mutações *missense* que alteram um aminoácido na proteína, defeitos no processo de *splicing* nos quais a remoção dos íntrons não é feita corretamente fazendo com que a leitura dos tripletos seja alterada e mutações *nonsense* nas quais surge um códon de terminação prematura que ocasiona o encurtamento da proteína, com consequente perda da atividade catalítica.

A maioria dos pacientes fenilcetonúricos é heterozigótico expressando duas mutações diferentes, o que contribui para a heterogeneidade clínica e bioquímica da doença.

A análise molecular da FAH é de extrema importância pois, geralmente o genótipo fornece uma previsão do fenótipo metabólico. No entanto, este fato nem sempre ocorre. Estudos revelam que, em alguns casos, na forma mais branda de HFA foram descritas mutações severas. Ou, a existência de duas mutações severas manifestou-se em um fenótipo brando, ao contrário do que se esperava. Em se tratando de uma desordem multifatorial, indivíduos que apresentam a mesma mutação genotípica podem não apresentar a mesma expressão fenotípica (FUSETTI *et al.*, 1998; ERLANDSEN *et al.*, 2003; HENDRIKSZ; WALTER, 2004; MITCHELL; SCRIVER, 2007). A Figura 10 mostra a localização do gene da FAH no cromossoma 12.

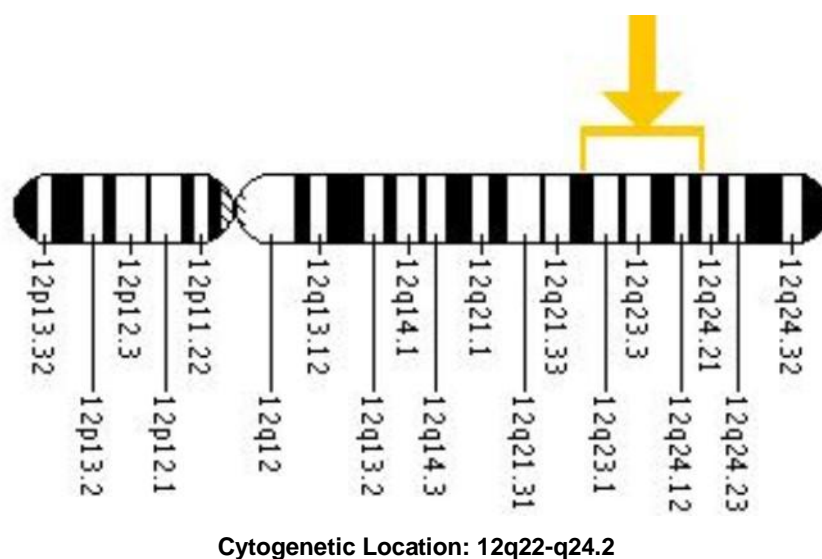


FIGURA 10 - LOCALIZAÇÃO MOLECULAR DA FAH NO CROMOSSOMO 12
 FONTE: <http://www.ghr.nlm.nih.gov/gene=pah>

Nos últimos quinze anos, pesquisas têm sido feitas quanto ao variado espectro de mutações existentes no continente europeu. Cada região está ligada à determinadas mutações, especialmente as regiões com elevado grau de imigração (SCRIVER; KAUFMAN, 2001). Entretanto, embora ocorra um variado espectro de mutações da FAH, apenas um pequeno grupo delas expressa a grande maioria dos genótipos da FNC em caucasianos (GÜTTLER; GULDBERG, 1994; SCRIVER; KAUFMAN, 2001).

2.10.4 Tetrahydrobiopterina (BH₄)

A tetrahydrobiopterina (BH₄) é normalmente conhecida como cofator não protéico que atua no catabolismo dos aminoácidos aromáticos. É essencial para vários processos metabólicos e provavelmente está presente em todas as células ou tecidos de organismos superiores. Assim, a BH₄ é essencial para a conversão da FAL à TIR juntamente com a FAH. Também participa da hidroxilação da TIR à L-dopa que na sequência origina a dopamina e da hidroxilação do triptofano originando o 5-hidroxitriptofano necessário para à síntese da serotonina (VILARINHO *et al.*, 2006). Na Figura 11 está demonstrado o mecanismo de ação da BH₄ na hidroxilação da FAL.

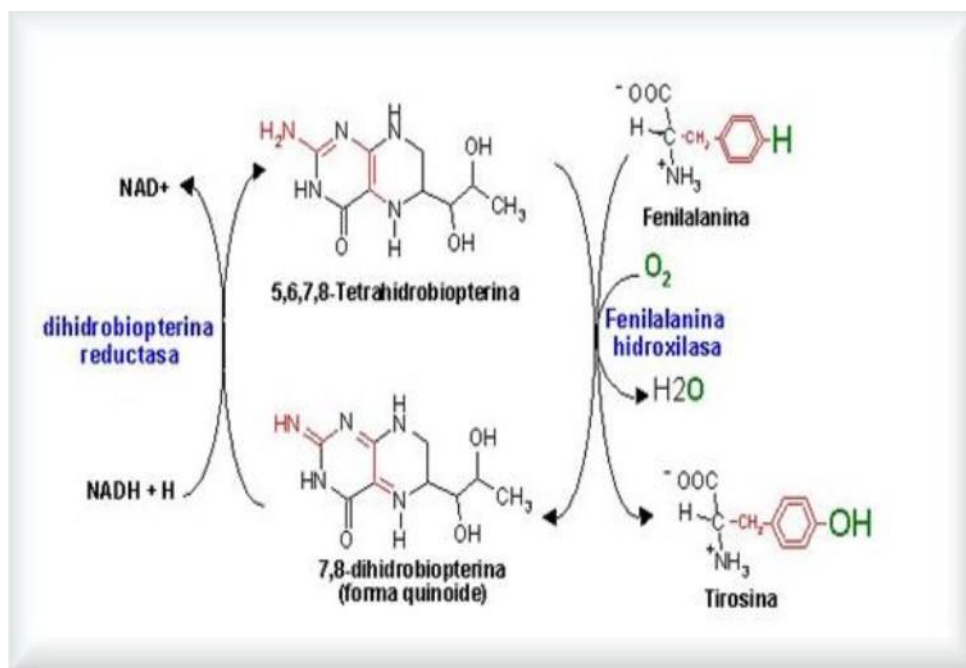


FIGURA 11 - MECANISMO DE AÇÃO DA (BH₄) NA HIDROXILAÇÃO DA FAL
 FONTE: laguna.fmedic.unam.mx/~evasquez/0403/enfermed

2.10.5 Características necessárias a um programa de triagem populacional (adaptado de *National Screening Committee*, 1998)

A doença deve:

- a) ser um problema importante de saúde pública;
- b) ter a sua história natural bem entendida;
- c) ser passível de diagnóstico no período pré sintomático ou sintomático inicial.

O teste deve:

- a) ser simples, seguro, confiável, barato e aceitável pelas pessoas que serão triadas;
- b) associar-se a valores bem estabelecidos e que separem claramente os indivíduos "em risco" daqueles "sem risco" (estabelecer valores de corte);
- c) ser sucedido, nos casos positivos, pela investigação diagnóstica;
- d) associar-se a um risco de causar danos físicos ou psicológicos às pessoas triadas menor do que a chance de que elas sejam beneficiadas pela triagem.

O tratamento deve:

- a) ser efetivo;
- b) associar-se a um melhor prognóstico, caso seja iniciado em período assintomático ou sintomático inicial da doença;

O programa de triagem deve:

- a) ser clinicamente, socialmente e eticamente aceitável;
- b) associar-se a acesso igualitário;
- c) ser custo-efetivo;
- d) possuir estrutura de suporte que garanta e que controle a sua qualidade.

Baseados nestas premissas, os programas de triagem neonatal foram inicialmente implantados para fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito e hoje estão sendo aplicados para um número crescente de enfermidades. Estes programas já estão bem consolidados nos países desenvolvidos, mas é ainda um desafio a sua aplicação eficiente em países do terceiro mundo (SOUZA, 2002).

2.10.6 A importância da triagem neonatal

Guthrie foi o primeiro realmente a demonstrar que o sangue do indivíduo poderia ser coletado em papel filtro, absorvido e seco e enviado ao laboratório para a análise. Seu trabalho inovador na triagem para FNC marcou o começo da triagem neonatal, não somente nos Estados Unidos e América do Norte na década de 60, mas em todo o mundo (TUOTO, 2009).

Por mais de quatro décadas a triagem neonatal tem se tornado um programa de saúde pública vital prevenindo deficiências e proporcionando benefícios à saúde das famílias e para a sociedade (THERRELL; ADAMS, 2007).

Diversos distúrbios metabólicos que se manifestam de forma grave e precoce podem ter sua história natural substancialmente alterada pela introdução de um tratamento em sua fase pré-clínica. O diagnóstico pré-sintomático só é possível através dos testes de triagem populacional em recém-nascidos (TUOTO, 2009).

2.10.7 A triagem neonatal no Brasil

A introdução dos programas de triagem neonatal no Brasil aconteceu de forma desordenada, assim como em outros países em desenvolvimento. Sem estrutura organizacional eficiente, precedeu a uma discussão ética em torno do assunto (SOUZA, 2002).

No Brasil, entre 1962 e 1963, o pediatra Dr. Benjamin José Schmidt juntamente com os colegas Aron Diamant e Oswaldo Cruz iniciaram, no Laboratório Lavoisier de Análises Clínicas em São Paulo, a pesquisa de alguns erros inatos do metabolismo (EIM)

Em 1973, Dr. Schmidt e cols. deram início ao projeto de um "plano nacional de estudos" para detecção de EIM que foi apresentado no congresso da APAE/SP, em Porto Alegre. Era uma proposta para a instalação e funcionamento do primeiro centro especializado de estudo populacional sobre a frequência da FNC, uma das causas de deficiência mental, o que se concretizou em 1975.

Para obtenção da amostra foi utilizado o método de coleta de sangue em papel filtro e a pesquisa e quantificação da FAL foi realizada através do método semiquantitativo BIA, ambos desenvolvidos por Guthrie, como descrito anteriormente (CORNEJO; RAIMANN, 1999).

No ano de 1976, foram realizados 13.666 exames para FNC, iniciando-se assim o primeiro programa de triagem neonatal para erros inatos do metabolismo da América Latina.

A influência da APAE-SP, especialmente do seu programa de triagem neonatal e do coordenador Dr. Benjamin Schmidt, contribuiu significativamente para a aprovação da Lei Estadual n.º 3.914/73 do Estado de S. Paulo (1973), que foi a primeira lei no Brasil tornando obrigatória a realização do teste de triagem neonatal para a fenilcetonúria (BRANDALIZE; CZERESNIAB, 2004; WITTIG; DOMINGOS, 2007).

Esta lei serviu de modelo e motivação para a aprovação de leis semelhantes em outros estados brasileiros, até que surgiu a Lei Federal n.º 8069/90 que rege o Estatuto da Criança e do Adolescente. Embora o próprio estatuto fizesse referência à obrigatoriedade do "Teste do Pezinho", dados extraoficiais do Ministério da Saúde (MS) indicaram que entre um terço e metade dos cerca de 3 milhões de recém-nascidos (RNs) brasileiros, no ano de 2000, não realizaram o teste. Alguns destes, podem tê-lo realizado em laboratórios privados que não informaram seus dados para estatísticas oficiais (CARVALHO; VARGAS; SANTOS, 2003).

Além da falta de cobertura também existia a falta de controle de qualidade e ausência de dados como a data de nascimento e a data da coleta, fundamentais para a organização de um programa de triagem neonatal (CARVALHO; VARGAS; SANTOS, 2003).

Em 2001, o Ministério da Saúde (MS) ciente da necessidade de se fazer cumprir a lei de maneira adequada, editou a Portaria Ministerial MS/GM n.º 822 (06 de junho de 2001) visando organizar uma rede de triagem neonatal no Brasil para alcançar maior abrangência, resultando no aumento do número de exames cobertos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (SOUZA, 2002; CARVALHO; VARGAS; SANTOS, 2003).

O local da punção capilar na coleta de amostras de sangue para os exames da triagem neonatal, em todos os programas existentes no mundo, é o calcanhar do recém-nascido. Por este motivo, o Dr Benjamin Schimidt o denominou de "Teste do Pezinho", o que contribuiu para ampliar a sua divulgação e despertar sua

importância para a população (WITTIG; DOMINGOS, 2007). A descrição da técnica de coleta para o Teste de Pezinho" encontra-se no Anexo 3.

No ano de 2008, o então Presidente da República Luiz Inácio Lula da Silva, baixou decreto instituindo o dia 06 de junho como "Dia Nacional do Teste do Pezinho".

2.10.8 A triagem neonatal no Paraná

O Programa de Triagem Neonatal (PTN) no Estado do Paraná é realizado pela Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE). A FEPE é uma instituição de caráter filantrópico credenciada pela Secretaria da Saúde do Estado do Paraná (SESA), junto ao Ministério da Saúde (MS), para realizar os exames preconizados pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). As doenças pesquisadas são: fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, fibrose cística e hemoglobinopatias. A FEPE realiza ainda, com recursos próprios, a pesquisa para a deficiência da biotinidase que está, no momento, em estudo de implantação, pelo MS, no Programa de Tiragem Neonatal Nacional (PNTN). São triados cerca de 15.000 recém-nascidos/mês (dados da FEPE – 2008).

A triagem neonatal no Paraná teve início em 1987 com a pesquisa para FNC e a metodologia utilizada, já nesta época, era a análise fluorométrica. Primeiramente, o equipamento utilizado foi o *Auto Analyser-Wallac®* que emitia valores de concentração através de picos a serem interpretados e calculados posteriormente. A partir do ano 2000, a pesquisa passou a realizar-se através do equipamento *Victor D 1420-020®* (Wallac), onde as concentrações são mensuradas e convertidas em mg/dL através do *software Multicalc®*. A Figura 12 mostra, à esquerda, o fluorômetro utilizado na FEPE para a determinação da fenilalanina.



FIGURA 12 - FLUORÔMETRO Victor 1420-0200® (Wallac-PerkinElmer)
FONTE: Laboratório do Centro de Pesquisas da FEPE

No programa de triagem neonatal da FEPE as amostras são obtidas por punção do calcanhar dos recém-nascidos e o sangue é depositado em papel filtro S&S 903 (ADAM *et al.*, 2000). O papel filtro contém um código de barras e está anexado a uma ficha de coleta com código idêntico. Nesta ficha constam campos a serem preenchidos com os dados da mãe e do recém-nato (no momento da coleta) e a mãe assina autorizando o exame, tomando conhecimento da obrigatoriedade e importância do teste. A ficha de coleta da FEPE consta no Anexo 4.

A orientação do PTNN é de que a coleta seja obtida após 48 horas de vida neonatal, preferencialmente entre o 3.º e 5.º dias após o nascimento, garantindo que ocorreu ingesta de leite (aporte proteico), que é um fator imprescindível, segundo a maioria das literaturas, para validar o resultado da pesquisa para a fenilcetonúria. No Paraná é recomendado que a coleta ocorra no momento da alta hospitalar (MARTON DA SILVA; LACERDA, 2003).

Uma amostra adequada deve apresentar material em quantidade suficiente para as análises, além de ausência de hemólise ou contaminação e chegada do material ao laboratório em no máximo 30 dias. Amostras com mais de 30 dias de coleta são consideradas envelhecidas. Devem ser secas à temperatura ambiente, longe de fontes de calor e enviadas em envelope padronizado ao laboratório da FEPE. Cabe ressaltar que todas as amostras são processadas, mesmo as classificadas como inadequadas.

Persistindo resultados alterados após repetição do teste com a mesma amostra, ou por motivo de má coleta, o Serviço Social da Fundação Ecumênica entra em contato diretamente com os familiares da criança (utilizando os dados constantes na ficha de coleta) comunicando a necessidade de novo exame. Se este contato não for possível, outros mecanismos são acionados na localização dos familiares, como a intermediação através da Unidade de Saúde próxima ou do Conselho Tutelar.

Apesar das orientações realizadas pelo Serviço de Enfermagem da FEPE, cerca de 6% das coletas são realizadas antes das 48 horas de vida, o que pressupõe-se afetar a interpretação do ensaio resultando em valores falsos negativos para a FNC.

A FEPE estabeleceu um protocolo de análise de acordo com os resultados obtidos: resultado normal até 2,9mg/dL; resultado com necessidade de repetição do teste: $\leq 0,2\text{mg/dL}$ e entre 2,5 e 3,0mg/dL; resultado alterado $\geq 3,0\text{mg/dL}$. Para os resultados $<0,2\text{mg/dL}$ e entre 2,5 e 3,0mg/dL, o ensaio é repetido com a mesma amostra. Para o resultado $\geq 3,0\text{mg/dL}$, o ensaio é repetido com a mesma amostra e, se persistir o valor alterado, é solicitada uma nova coleta para confirmar a suspeita de FNC. O protocolo detalhado encontra-se no Anexo 5.

TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO DE FENILALANINA - PROTOCOLO DA FEPE

RESULTADOS	CRITÉRIOS ADOTADOS PELA FEPE
Normal	$<3,0\text{mg/dL}$ ($< 181,8\mu\text{mol/L}$)
Repetição do teste	0,2 e 2,5-3,0mg/dL ($<12,12$ e $151-182\mu\text{mol/L}$)
Alterado (presuntivo positivo)	$\geq 3,0\text{mg/dL}$ ($>182\mu\text{mol/L}$)

FONTE: O autor (2011) adaptado do Protocolo para FNC da FEPE

O atendimento ambulatorial das crianças com FNC detectadas pela triagem neonatal na FEPE é realizado mensalmente até o 6.^o mês de vida. Este procedimento se faz necessário para o ajuste da fórmula especial devido ao aumento rápido de peso nesta faixa etária e pela introdução da "papinha" salgada e frutas. Após 1 ano, o acompanhamento é trimestral; após 3 anos, é quadrimestral e após 5 anos, a cada 6 meses (dados da FEPE - 2008).

Em fevereiro de 2007, a FEPE recebeu recurso financeiro da Secretaria da Ciência e da Tecnologia, para a aquisição do espectrômetro de massas sequencial *Micro Mass Quattro micro®* (Wallac). Esta nova tecnologia possibilita a pesquisa de 26 erros inatos de metabolismo (EIM), entre eles a FNC. Na Figura 13 observa-se o sistema de espectrometria de massas da FEPE constando, da esquerda para a direita: equipamento de informática, bomba HPLC de diluição, auto-amostrador,

espectrômetro de massas, incubadora, bomba de vácuo, gerador de nitrogênio e cilindro de gás argônio.



FIGURA 13 - SISTEMA MS/MS *Micro Mass Quattro Micro*®

FONTE: Centro de Pesquisas da FEPE

NOTA: A = *Micro Mass Quattro micro*® B = incubadora; C = bomba de vácuo; gerador de nitrogênio e cilindro de argônio.

Estima-se que, desde o início da triagem neonatal até meados de 2011, cerca de 3.487.000 RNs foram triados no Paraná resultando no diagnóstico 145 casos de FNC (dados da FEPE - 2011).

2.11 MÉTODOS UTILIZADOS EM TRIAGEM NEONATAL DA FNC

Os métodos e tecnologias para a identificação da FNC evoluíram durante os anos. Inicialmente, a triagem era apenas qualitativa. Na década de 60 surgiu o método semiquantitativo de Guthrie e mais tarde, os métodos quantitativos. O ensaio semiquantitativo ainda é utilizado por alguns programas de triagem neonatal.

A partir dos anos 90 foi introduzida nos Estados Unidos e na sequência em outros países, a triagem neonatal por espectrometria de massas (RINALDO; TORTORELLI; MATEM, 2004).

2.11.1 Método qualitativo

Este método é realizado na urina e denominado de "Teste do Cloreto Férrico". Foi bastante utilizado em décadas passadas e tinha como objetivo rastrear a FNC em grupos especiais, como deficientes mentais institucionalizados e avaliar lactentes em famílias que tinham membros com FNC.

Sendo qualitativo, era sujeito à ocorrência de resultados falso-negativos ou falso-positivos pela interação com medicamentos e outras substâncias que poderiam estar presentes na urina. Era referido como "teste da fralda", pois o reagente era adicionado diretamente nas fraldas encharcadas de urina (ANTUNES *et al.*, 1990).

2.11.2 Métodos semiquantitativos

Dois métodos semiquantitativos são utilizados em triagem neonatal: o teste de inibição bacteriana de Guthrie (BIA) e a cromatografia em camada delgada (CCD).

2.11.2.1 Teste de inibição bacteriana (BIA)

O teste de inibição bacteriana (BIA) foi desenvolvido em 1961 por Robert Guthrie, considerado o "pai da triagem neonatal".

Fundamenta-se na leitura da inibição bacteriana obtida a partir de uma determinada concentração da bactéria *Bacillus subtilis* semeada em placa, onde são depositadas amostras de sangue seco em papel filtro. A interpretação do resultado é baseada na amplitude do halo de inibição produzido no crescimento bacteriano

devido à presença da FAL no sangue. Portanto, a inibição do crescimento bacteriano é proporcional à concentração de fenilalanina da amostra (GUTHRIE; SUSI, 1963). Paulatinamente adotado nos Estados Unidos, o método foi finalmente recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a partir de 1968, passando a ser utilizado por outros países (BLAU, 1983).

O fator desfavorável do teste é que pode haver interferência por antibioticoterapia (DOOLEY, 1992).

2.11.2.2 Cromatografia de aminoácidos em camada delgada (CCD)

É um método físico-químico de separação fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura, o que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis: a fase móvel e a fase estacionária.

Este teste permite identificar, além da FAL, a presença de outros aminoácidos, o que possibilita a identificação de outros erros do metabolismo (DEGANI; KASS; VIEIRA, 1998).

2.11.3 Métodos quantitativos

São métodos que permitem a identificação e quantificação da FAL em amostra de sangue coletado em papel filtro: método enzimático colorimétrico que utiliza a fenilalanina-desidrogenase; método fluorométrico de McCaman e Robins modificado; método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) e mais recente, método de espectrometria de massas sequencial ou em *tandem* (MS/MS).

2.11.3.1 Método enzimático colorimétrico utilizando a fenilalanina-desidrogenase (método *Quantase*)

O método *Quantase*® (marca registrada da *Quantase Ltd.*®) destina-se à determinação quantitativa e específica da FAL em amostras de sangue seco de recém-nascidos na triagem da FNC. Foi desenvolvido no Canadá, em 1992. Utiliza a enzima fenilalanina-desidrogenase na catálise da deamonização oxidativa da FAL para piruvato e amônia, que é um processo NAD-dependente. O NADH produzido é medido colorimetricamente usando o *tetrazolium* através de um sistema de elétron intermediante reconhecido (DOOLEY, 1992).

As vantagens sobre o método fluorométrico refletem-se na ausência da interferência de antibióticos (o uso de antibiótico pode resultar em falsos positivos pelo aumento da fluorescência) ou componentes endógenos que podem produzir substâncias fluorescentes na amostra. Além de menor índice de resultados falsos positivos em relação ao método enzimático tradicional (fluorométrico), o método demonstrou acurácia e linearidade (RIVERO *et al.*, 2000).

2.11.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC)

Antes da década de 70 poucos métodos cromatográficos confiáveis eram comercialmente disponíveis para pesquisas em laboratório. Neste período, a maioria das separações químicas era realizada através de uma variedade de técnicas, incluindo: cromatografia de coluna aberta, cromatografia em papel e cromatografia em camada delgada. No entanto, estas técnicas cromatográficas eram insuficientes para a quantificação e para a identificação precisa de compostos semelhantes devido a dificuldade na separação dos analitos. Foi quando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou *high performance liquid chromatography* (HPLC) começou a ser utilizada com a vantagem de diminuir o tempo de fluxo devido à purificação dos compostos por coluna cromatográfica. Foi rapidamente melhorada pelo desenvolvimento do empacotamento das colunas e desempenho dos detectores. Na década passada houve grande expansão do mercado na produção de micro colunas e de colunas

específicas para determinadas pesquisas. O diâmetro usual de uma micro coluna (coluna capilar) varia de 3 μ m a 200 μ m. A cromatografia líquida compõe-se de uma coluna chamada de fase estacionária, uma bomba que desloca a fase móvel através da coluna e um detector que mostra os tempos de retenção das moléculas. O tempo de retenção (t_r) varia de acordo com as interações entre a fase estacionária, as moléculas analisadas e o tipo de solvente utilizado. O t_r é determinado pelo tempo de arraste do analito pela fase móvel dentro da coluna cromatográfica até o momento de sua saída da mesma. Sob condições especiais, caracteriza a identificação de um determinado analito. Embora o método de HPLC seja amplamente considerado uma técnica essencial em biotecnologia, biomedicina, bioquímica e investigação, a sua utilização abrange apenas, cerca de 50% nestas áreas (KNOX; KAUER, 1989).

2.11.3.3 Método fluorométrico

A fluorometria é um dos métodos mais utilizados em triagem neonatal para FNC pelo seu desempenho como teste de triagem e viabilidade de custo.

Um fluorômetro de filtro geralmente consta de uma lâmpada de mercúrio ou halogêneo, um filtro primário para transmitir o comprimento de onda desejado, uma cubeta porta-amostras, um tubo fotomultiplicador que mede a emissão fluorescente, um fotodetector e um segundo filtro para absorver a radiação de excitação dispersada. A leitura é proporcional à concentração e as medições podem estender-se à concentrações extremamente pequenas aumentando-se a sensibilidade do fotodetector ou a intensidade da fonte de radiação. As medições de fluorescência têm usualmente, como parâmetro de referência, um padrão arbitrariamente escolhido (CECHAK; ZIDLICKY, 1977; WILLARD *et al.*, 1991). A Figura 14 mostra, esquematicamente, componentes de um fluorômetro.

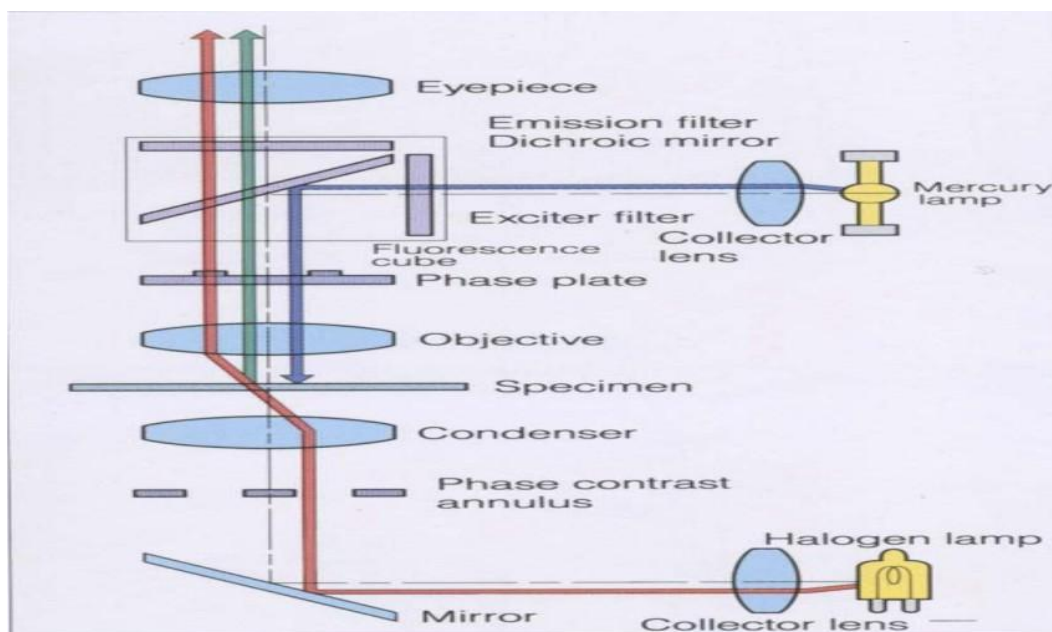


FIGURA 14 - DESENHO ESQUEMÁTICO DE UM FLUORÔMETRO
 FONTE: www.vaclan-ieo.es/proyecto04.html

O método de fluorometria modificado é um ensaio de microtécnica que tem como base o ensaio publicado por McCaman e Robins em 1962 (McCAMAN; ROBINS, 1963). O teste baseia-se na intensificação da fluorescência de um produto da reação fenilalanina-ninhidrina pelo dipeptídeo L leucil-L alanina. Um tampão succinato é utilizado para otimizar a fluorescência e aumentar a especificidade. Também é utilizado um reagente de cobre para melhorar o desempenho da reação e reduzir as interferências. Este método faz doseamento quantitativo da FAL na presença de outros aminoácidos (GERASIMOVA; STEKLOVA; TUUMINEN, 1989).

2.11.3.4 Método de espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS)

A aplicação da espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) nos processos bioanálíticos é relativamente recente. Hunt e cols. em 1982, fizeram a primeira aplicação do MS/MS em bioquímica traçando o perfil metabólico urinário dos ácidos carboxílicos (HUNT *et al.*, 1982).

Desde então, esta técnica tem sido extensivamente utilizada para resolver várias análises biológicas como a identificação de oligopeptídeos, ácidos nucleicos e nucleotídeos. É também utilizada em sequenciamento de proteínas e para análise

rápida de drogas e seus metabólitos (CHACE *et al.*, 1993; CHACE; KALAS; NAYLOR, 2002; CHACE; KALAS, 2005; WILCKEN *et al.*, 2003).

Uma das principais vantagens do MS/MS é a capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativas em misturas complexas com pequena quantidade de amostra. Esta vantagem existe pela possibilidade de se acoplar, por exemplo, uma coluna de cromatografia gasosa (CG) ou uma coluna de HPLC ao analisador de massas, com a finalidade de separar os analitos de interesse, consequentemente, diminuindo o tempo de análise (RASHED; RAHBEENI; OZAND, 1999).

O MS/MS possui um triplo quadrupolo com dois analisadores de massas, MS1 ou Q1 e MS3 ou Q3 em sequência (*tandem*), separados por uma célula de colisão, MS2 ou Q2. A identificação e quantificação dos analitos baseia-se nas suas massas moleculares e nas suas cargas, razão massa/carga (m/z).

Para proceder à análise, o analito de interesse deve ser convertido em fase gasosa, vaporizado e ionizado. Os analitos, antes da análise, são geralmente derivatizados (quando método derivatizado) com a finalidade de mudar suas propriedades químicas. Este procedimento aumenta a sensibilidade e a especificidade do ensaio. Algumas técnicas de ionização estão disponíveis como: ionização química, ionização por eletro impacto e ionização por *eletrospray*.

A ionização por *eletrospray* (ESI-MS/MS) é a técnica mais robusta e extremamente sensível que tem sido recentemente utilizada na área de bioquímica e genética (RASHED; RAHBEENI; OZAND, 1999; LUKACS; SANTER, 2006).

Para ionizar uma amostra utilizando-se a técnica de *eletrospray* (ESI), a amostra é primeiramente solubilizada numa mistura de água e um solvente orgânico (metanol, isopropanol ou acetonitrila) denominada de fase móvel. Esta amostra ao entrar no equipamento recebe um fluxo de gás nitrogênio chamado de gás de dessolvatação tornando-se então, vaporizada. A amostra vaporizada segue através de um tubo capilar indo ao encontro de um forte campo elétrico (MS1 ou primeiro quadrupolo) onde os íons são separados, conforme o interesse, pelas suas razões massa/carga (m/z). Estes íons são chamados de precursores ou "íons pais". Uma vez selecionados, seguem para o compartimento MS2 ou célula de colisão sofrendo fragmentação pela ação de um gás inerte, geralmente o argônio. Os íons fragmentados são então chamados de íons produtos ou "íons filhos". Esses íons, podem estar carregados positivamente, negativamente ou se apresentarem como moléculas neutras. No terceiro quadrupolo (Q3), os íons produtos ou "íons filhos" são analisados e

apresentados ao detector para quantificação e identificação (GARG; DASOUKI, 2006). A Figura 15 apresenta, esquematicamente, a análise de uma amostra no MS/MS em *tandem* no modo de perda neutra.

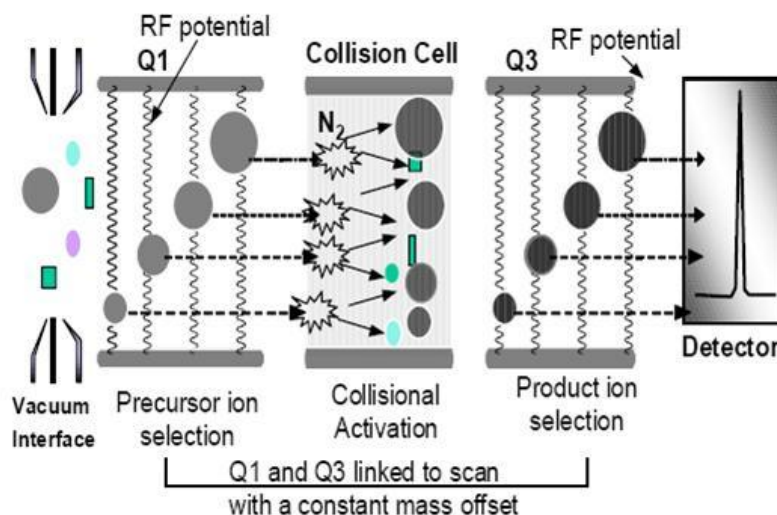


FIGURA 15 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO MS/MS
 FONTE: Perkinelmer Life and Analytical Sciences, W.O (2007a)

O MS/MS pode operar em três modos de leitura: íon precursor de 85, perda neutra de 46 e modo de reação monitorada (MRM).

No modo do íon precursor de 85, o quadrupolo 1 (Q1) lê as massas dos analitos da menor para a mais elevada, enquanto que o quadrupolo 3 (Q3) está fixado para permitir apenas a passagem de íons de razão massa/carga (m/z) de 85. À medida em ocorre a leitura no Q1 cada íon precursor é enviado para a célula de colisão. Se esse íon produzir um fragmento iônico com m/z de 85, será enviado para o Q3, sendo então detectado. Um algoritmo relaciona a detecção de um íon m/z de 85 e a m/z em que o Q1 estava nesse momento. Assim, o que é apresentado no espectro do MS/MS são os valores de m/z de todos os íons precursores que geraram um produto numa m/z de 85.

No modo de leitura de perda neutra de 46 o Q1 lê um intervalo de massas particular, enquanto o Q3 é programado para ler o mesmo intervalo de massa, mas com um desvio de massa constante em relação ao Q1. Esse desvio de massa corresponde a uma perda neutra frequente dos íons precursores após a fragmentação. Na maior parte dos aminoácidos essa perda é equivalente a 46 unidades de massa atômica

(*uma*), pela perda de H_2O e CO . Portanto, para a identificação e a quantificação dos aminoácidos, o Q3 está programado para ler um desvio constante da massa do Q1 com menos 46 *uma*. À medida em os íons são selecionados pelo Q1 e dirigidos para a célula de colisão, apenas aos íons produto que resultam da perda de 46 *uma* é permitida a passagem pelo Q3 sendo assim, detectados.

O terceiro modo de leitura que pode ser realizado pelo MS/MS é chamado de modo de reação monitorada (MRM). Essa leitura segue o mesmo princípio das anteriores descritas, porém, aqui o Q1 não está programado para ler um intervalo de massas da menor para a maior, mas irá selecionar um íon precursor particular. O íon precursor selecionado é enviado para a célula de colisão e o produto desejado é especificado em Q3 (PERKINELMER LIFE AND ANALYTICAL SCIENCES, 2007a).

O uso do MS/MS como ferramenta de *screening* (triagem) possui várias características que não são encontradas em outras técnicas clássicas. Amplo espectro de determinações no mesmo teste, rapidez (o tempo analítico para cada amostra é de 2 minutos), sensibilidade e especificidade.

Rashed e cols, apresentaram o resultado de 3 anos de estudo em uma população de recém-nascidos da Arábia Saudita pesquisando e quantificando o ácido argino-succínico no sangue coletado em papel filtro. O objetivo do estudo era determinar a deficiência da argino-succinase. Foram analisadas 27.624 amostras e identificados 20 casos, Segundo o relato, não foram encontrados casos falso negativos nestas amostras já analisadas anteriormente por outras técnicas, mas vários falso-positivos foram eliminados depois da análise por MS/MS. Neste período foram também pesquisadas: acidemia glutárica, citrulinemia e fenilcetonúria tetrahidrobiopterina dependente (RASHED; RAHBEENI; OZAND, 1999; FEARING; LEVY, 2003; RINALDO; TORTORELLI; MATEM, 2004).

O equipamento de espectrometria de massas utilizado neste estudo é o de ionização por *eletrospray* (ESI) por método não derivatizado e no modo de perda neutra.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO

Este estudo é de caráter observacional, retrospectivo, transversal e por conveniência, realizado com 528 amostras obtidas no período de 2008 a 2009, através do Programa de Triagem Neonatal (PTN) da Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE), entidade credenciada pela Secretaria da Saúde do Estado do Paraná (SESA-Pr) junto ao Ministério da Saúde (MS), para realizar a triagem neonatal em todo o Estado.

3.2 AMOSTRAS

As amostras foram tomadas aleatoriamente quanto à etnia, gênero e procedência, priorizando, para a formação dos grupos de estudo, as datas do nascimento do recém-nascido e da coleta para o Teste do Pezinho, o peso e a concentração de fenilalanina obtida por fluorometria. Foi avaliado a qualidade da coleta sendo excluídas amostras que apresentavam hemólise, ressecamento, contaminação, transfusão sanguínea, envelhecimento e quantidade insuficiente de sangue no papel filtro. Cabe ressaltar que todas as amostras que chegam à FEPE são analisadas previamente quanto à qualidade da coleta. O rastreio quanto ao tempo de coleta é realizado pelo programa de informática da FEPE que classifica a amostra com código específico. Quanto à amostras ressecadas, o parâmetro utilizado é o comportamento das amostras na focalização isoelétrica e na cromatografia de alto desempenho (HPLC), empregados na triagem da doença falciforme (pesquisa que faz parte do PTN). Nestes testes torna-se evidente quando uma amostra não eluiu. A leitura mostra-se difusa na corrida da amostra no gel da focalização isoelétrica e picos baixos, com baixa área de concentração de sangue, no cromatograma do HPLC (protocolo de trabalho da FEPE desde 2001).

As amostras foram classificadas, conforme as suas características, em 6 grupos:

- G.1 ou "grupo controle" - 108 amostras de sangue de recém-nascidos com peso superior a 2,5kg e com coleta após 48 horas de vida.
- G.2 ou "grupo coleta precoce" – 84 amostras de sangue de recém-nascidos com peso acima de 2,5kg, mas que tiveram a coleta para a triagem neonatal antes de 48h de vida.
- G.3 ou "grupo 2.^a coleta" – 84 amostras dos mesmos recém-nascidos que tiveram coleta precoce e que foram submetidos à uma segunda coleta em Unidade de Saúde, mais ou menos uma semana após a alta hospitalar.
- G 4 ou "grupo baixo peso" – 49 amostras de sangue de recém-nascidos com peso igual ou inferior a 2,2kg e com coleta após 48h de vida.
- G 5 ou "grupo limítrofe" – 80 amostras que no ensaio fluorométrico (método utilizado em triagem neonatal para fenilcetonúria na FEPE) apresentaram resultados da concentração da fenilalanina entre 2,1 e 2,9mg/dL.
- G 6 ou " grupo FNC – 123 amostras de recém-nascidos, crianças e adolescentes com diagnóstico confirmado de FNC e que, no período de 2008 a 2009 estavam em acompanhamento médico e nutricional no ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFPR.

O parâmetro de baixo peso para crianças com 2,2kg foi tomado, para este estudo, com base no peso da maioria dos RNs, que situa-se acima de 2,5kg.

A classificação e as características dos grupos estão apresentadas no Quadro 1.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR sob o registro CEP/SD: 568.105.08.07 e CAAE: 2409.0.000.091-08 (Anexo 1).

GRUPOS	N.º DE AMOSTRAS	DENOMINAÇÃO	DESCRIÇÃO
1.º	108	Controle	Amostras de sangue de recém-nascidos saudáveis com concentrações normais de fenilalanina pelo método fluorométrico, coleta adequada após 48 horas de vida, antecedida por alimentação láctea e peso ao nascer igual ou superior a 2,5kg.
2.º	84	Coleta Precoce	Amostras de recém-nascidos com coleta antes de 48 horas de vida.
3.º	84	2.ª Coleta	Amostras de recém-nascidos do grupo 2 coletados após 48 horas de vida recebendo ingesta láctea.
4.º	49	Baixo Peso	Amostras de recém nascidos com peso corporal menor ou igual a 2,2kg, coletadas após 48 horas de vida.
5.º	80	Limítrofe	Amostras de recém-nascidos com concentrações de fenilalanina medidas por método fluorométrico com resultados entre $\geq 2,1$ e $\leq 2,9$ mg/dL, apresentando peso $\geq 2,5$ kg e coleta após 48 horas de vida.
6.º	123	FNC	Amostras de pacientes com fenilcetonúria (FNC) confirmada por diagnóstico laboratorial e em acompanhamento clínico. O grupo contempla desde recém-natos até adolescentes.

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS EM ESTUDO
 FONTE: O autor (2011)

3.2.1 Análise das características das amostras entre os grupos estudados

Foram analisadas e comparadas as características das amostras quanto ao gênero, idade em dias (do grupo 1 ao 5) e em anos (grupo 6), peso e etnia, no total de amostras e em cada grupo. Estes parâmetros foram obtidos dos dados da ficha de coleta.

3.2.2 Análise da estabilidade da FAL em tempo "zero", 24, 48 e 72h em amostras mantidas em temperatura de 37°C

Amostras de uma única fonte e preparada em papel de filtro padronizado, foi analisada em duplicata pelos dois métodos em estudo. Após análise no tempo zero (basal), a amostra foi testada em 24, 48 e 72h sendo mantida em estufa a 37°C, neste período.

3.2.3 Análise da variabilidade analítica interensaio

Uma amostra de única fonte foi submetida a um teste de repetibilidade (20 vezes) nos métodos fluorométrico e de espectrometria de massas para avaliar a imprecisão dos ensaios

3.2.4 Análise dos resultados das amostras por fluorometria e por espectrometria de massas nos grupos avaliados

As amostras dos grupos estudados foram analisadas quanto aos resultados obtidos para a fenilalanina por fluorometria e por espectrometria de massas. Também foram analisadas as concentrações de tirosina e a relação FAL/TIR obtidas no MS/MS. As concentrações em ambos os métodos foram convertidas em mg/dL.

- a) Estudo da comparação da concentração de FAL utilizando o teste t Student e a correlação de Pearson para os diferentes grupos

As amostras em estudo foram submetidas ao ensaio de probabilidade de distribuição t Student e à mensuração da correlação entre as variáveis: concentração de FAL por método fluorométrico e por espectrometria de massas.

- b) Estudo das análises de regressão para cada grupo estudado e para o total de amostras

Análises de regressão foram propostas para descrever a relação entre as duas variáveis de interesse: concentração de FAL por método fluorométrico e por espectrometria de massas.

- c) Estudo da concentração de fenilalanina por fluorometria e por espectrometria de massas entre os grupos: controle, limítrofe e indivíduos com FNC

Este estudo foi realizado para avaliar a distribuição dos resultados da FAL por fluorometria e por espectrometria de massas frente os valores de corte determinados pelos Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) do Ministério da Saúde: PCDT de 2002, 4,0mg/dL e do PCDT de 2010, 2,0mg/dl.

3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras foram analisadas na sua totalidade e por grupo, quanto às suas características: gênero, idade em dias (G1 a G5) e idade em anos (G6), etnia, peso, concentração de fenilalanina por fluorometria e concentração e coeficiente da relação FAL/TIR obtidas por espectrometria de massas. Obtidas de sangue total seco e coletadas em papel de filtro S&S 903 foram picotadas em picotadores automatizados tipos *MultiPuncher*1296-81® (Wallac-PerkinElmer) ou *DBSPuncher*® 1296-071 (Wallac-PerkinElmer). Os discos de papel filtro com diâmetro 3,2mm foram transferidos para microplacas de 96-poços, identificadas por código de barras. A leitura dos códigos de barras das microplacas gerou o protocolo da rotina e alimentou, através de interfaciamento, os analisadores automáticos para a quantificação da fenilalanina, quer por fluorescência ou por espectrometria de massas.

3.3.1 Método fluorométrico modificado (McCaman e Robins)

O método fluorométrico modificado é o ensaio utilizado pelo fabricante do *kit Wallac Neonatal Phenylalanine*® (NP-4000), composto de reagentes e calibradores. Para este estudo foi utilizado o lote n.º 472346. A Figura 16 mostra as reações que ocorrem na determinação da fenilalanina pelo método fluorométrico utilizado.

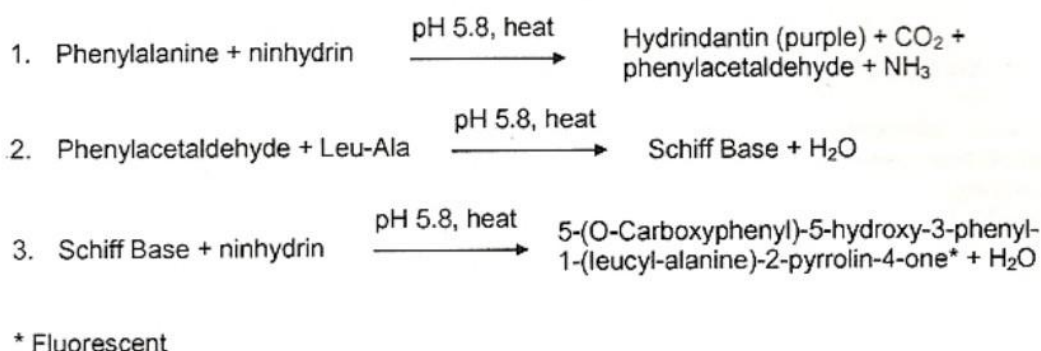


FIGURA 16 - ENSAIO FLUOROMÉTRICO MODIFICADO
 FONTE: Bula do Kit Neonatal Phenylalanine NP-4000® - (PerkinElmer)

A determinação dos resultados presuntivos positivos para a FNC é baseada em valores de corte que distinguem os resultados presuntivos negativos e dos resultados presuntivos positivos, estabelecidos conforme testes preliminares realizados pelo fabricante do *kit* de fluorometria. Uma zona de equívoco é utilizada para refletir a imprecisão do ensaio. O resultado dos testes podem variar conforme a idade da criança e do tempo de coleta da amostra ou em outras condições adversas (PERKINELMER LIFE AND ANALYTICAL SCIENCES, 2007b).

É recomendável que os valores da literatura fossem utilizados apenas como orientação e que cada laboratório estabelecesse seus próprios valores de corte conforme sua população (CECHAK; ZIDLICKY, 1977).

Os valores estabelecidos pela literatura e adotados pela FEPE, na metodologia fluorométrica, são validados para a detecção da FNC e podem ser reproduzidos quando re-testados (dados da FEPE - 2008).

3.3.1.1 Desenvolvimento do ensaio

A primeira etapa da análise consistiu em estabelecer a curva padrão com os reagentes em uso. A calibração do ensaio foi preestabelecida pelo fabricante do reagente para cada lote, e a validação do teste foi realizada por controles em dois níveis (alto e baixo), tratados de forma similar à amostra e presentes em todas os ensaios.

Em cada poço das microplacas foi picotado um disco de papel filtro de 3,2mm da microplaca, caracterizando um paciente ou controles. Foram dispensados 15µL da solução extratora (72mL de sulfato de zinco 25% + 48 mL de etanol PA), com pipeta multicanal. A mistura ficou em repouso por 40 minutos. Após este período, utilizando-se o dispensador automático *Nichiryo*²® (Wallac) foram adicionados 40µL de água deionizada tipo 1 (*Permutation*®) em cada poço. Na sequência, as placas foram submetidas à agitação (sistema *Delfia Wallac*®) em baixa rotação, por cerca de 2 minutos.

Posteriormente, 25µL do eluato das amostras e controles foram transferidos para novas placas identificadas com códigos de barras semelhantes e, no sistema de dispensação *Nichiryo*®, foram dispensados 50µL de solução de ninhidrina

tamponada acrescida de L leucil – L alanina. As placas foram então incubadas a 60°C por 45 minutos (*NCS Incubator*® (Wallac). Após a incubação foram transferidas para o sistema automatizado de dispensação *Delfia-Plate Dispenser*®, sendo adicionado, em cada poço, 200µL da solução otimizada (sufato de cobre 0,05% em solução contendo carbonato de sódio e tartarato duplo de sódio e potássio). A solução de cobre teve a finalidade de aumentar a fluorescência da reação e reduzir a fluorescência de fundo (*background*), aumentando a especificidade para a FAL.

A leitura da fluorescência (Excitação = 390 nm e Emissão = 486nm) foi realizada em fluorômetro *Victor*® 1420-020 (Wallac-PerkinElmer). Os resultados da concentração de fenilalanina, em cada amostra, foram calculados a partir do *software* do sistema automático da análise fluorométrica (*Multicalc*® (Wallac-PerkinElmer). As Figuras 17 e 18 mostram o dispensador da solução de ninhidrina, *Nichiryo*® e o sistema *Delfia Plate Dispenser*® utilizado na dispensação da solução de cobre, respectivamente.



FIGURA 17 - DISPENSADOR *NICHIRYO* (WALLAC – PERKINELMER)
FONTE: Laboratório do Centro de Pesquisas da FEPE



FIGURA 18 - EQUIPAMENTO *DELFIA-PLATE DISPENSER* (WALLAC-PERKINELMER)

FONTE: Laboratório do Centro de Pesquisas da FEPE

3.3.2 Método de espectrometria de massas em *tandem* não derivatizado

As análises foram realizadas no espectrômetro de massas (MS/MS) *Micro Mass Quattro micro®* comercializado pela *PerkinElmer Life and Analytical Sciences* (Wallac, Oy). Os reagentes, padrões e controles utilizados foram os fornecidos pela fabricante do equipamento de espectrometria designados *NeoGram® Amino Acids and Acylcarnitines Non-derivatized Tandem Mass Spectrometry Kit* (MS-8980EY) (PerkinElmer). Todos os procedimentos foram realizados conforme as recomendações contidas nas instruções de uso do reagente empregado. Os padrões internos para aminoácidos e acilcarnitinas foram reconstituídos com a solução do *kit* e se mantiveram estáveis em temperatura entre 2 e 8°C por 30 dias.

3.3.2.1 Desenvolvimento do ensaio

Foi preparado em balão volumétrico de 20ml a solução de extração utilizada na de 1:200. Desta solução, com pipeta automática foram transferidos, para cada poço da microplaca em que as amostras (discos de papel filtro) foram picotadas, 190µL.

As placas foram vedadas com folha de alumínio, presente no *Kit*, para evitar a evaporação e extravasamento. Foram incubadas por 30 min e à temperatura de 30°C com agitação de 650-750 rpm, em equipamento *NCS Incubator®* (Wallac).

Na sequência, as placas foram colocadas no amostrador automático acoplado ao espectrômetro de massas (MS/MS) e os parâmetros do ensaio foram estabelecidos. Para a detecção da fenilalanina, neste estudo, foi utilizado o modo de perda neutra (46 *uma*).

As quantificações da razão massa/carga (m/z) dos analitos e dos padrões internos deuterizados foram convertidas em forma numérica para a unidade de $\mu\text{mol/L}$ através do *software NeoGram²®* que gerencia os resultados obtidos. O tempo de análise por amostra foi em torno de 2 minutos.

3.3.3 Analitos quantificados no MS/MS

O espectrômetro de massas (MS/MS) *Micro Mass Quattro micro®* quantifica, em cada amostra analisada, os analitos descritos no Quadro 2.

AMINOÁCIDOS	ACILCARNITINAS
Alanina	Carnitina Livre (C0)
Arginina	Acetilcarnitina(C2)
Citrulina	Propionilcarnitina(C3)
Glicina	Malonilcarnitina(C3DC)
Isoleucina	Butirilcarnitina(C4)
Leucina	3-Hidroxi-Butiril (C4OH)
Metionina	Metilmalonilcarnitina (C4DC)
Ornitina	Isovalerilcarnitina (C5)
Fenilalanina	Glutarilcarnitina (C5DC)
Tirosina	3-Hidroxi-Isovalerilcarnitina (C5OH)
Valina	Hexanoilcarnitina (C6)
	Octanoilcarnitina (C8)
	Octenoilcarnitina (C8:1)
	Decanoilcarnitina (C10)
	Decenoilcarnitina (C10:1)
	Decadinoilcarnitina (C10:2)
	Dodecanoilcarnitina (C12)
	Dodecenoil (C12:1)
	Tetradecanoilcarnitina (C14)
	Tetradecenoilcarnitina (C14:1)
	Tetradecadienoilcarnitina (C14:2)
	3-Hidroxi-Tetradecanoilcarnitina (C14OH)
	Hexadecanoilcarnitina (C16)
	Hexadecenoilcarnitina (16:1)
	3-Hidroxi-Hexadecanoil (C16OH)
	3-Hidroxi-Hexadecenoilcarnitina (C16:1OH)
	Octadecanoilcarnitina (C18)
	Octadecenoilcarnitina (C18:1)
	Octadecanodienoilcarnitina (C18:2)
	3-Hidroxi-Octadecanoilcarnitina (C18OH)
	3-Hidroxi-Octadecenoil (C18:1OH).

QUADRO 2 - ANALITOS ANALISADOS NO MS/MS *Micro Mass Quattro Micro®*

FONTE: Adaptado da Bula do Kit NeoGram Amino acids and acylcarnitines non-derivatized tandem mass spectrometry - (PerkinElmer)

A Figura 19 mostra 2 espectros de análise de fenilalanina com os picos de padrão interno e os picos do analito de um indivíduo afetado e de um indivíduo normal.

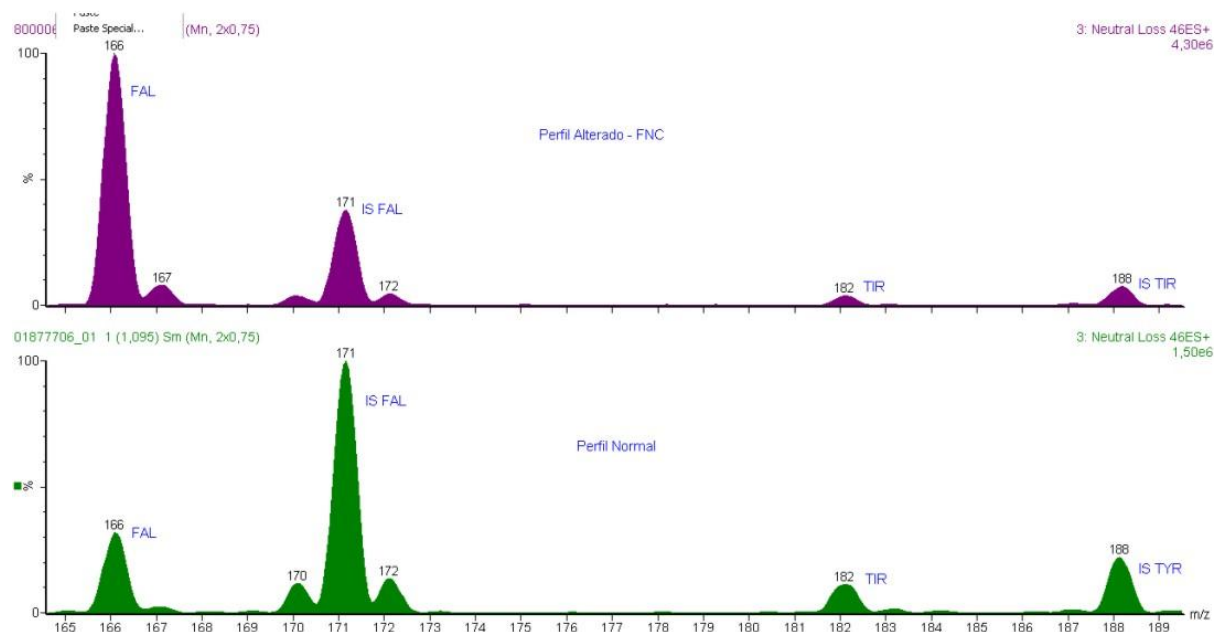


FIGURA 19 - ESPECTRO DO PADRÃO INTERNO DA FAL=E DA FAL DO ANALITO = POR MÉTODO NÃO DERIVATIZADO (ANÁLISE DE AMOSTRA COM CONCENTRAÇÃO ALTERADA DE FAL)

FONTE: Laboratório de Espectrometria de Massas da FEPE

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística e figuras foram realizadas com o *software Statistica® v. 5.5* (StatSoft Inc., Tulsa OK, USA).

Um valor de probabilidade menor que 5% ($p < 0,05$) foi considerado significativo em todas as comparações.

Para as comparações com variáveis contínuas foram utilizados os testes t Student e análise de variância (ANOVA).

Variáveis que não apresentaram distribuição normal foram normalizadas por transformação logarítmica ou analisadas pelo teste U de Mann-Whitney.

As variáveis descontínuas foram comparadas com o teste do Quiquadrado ou teste exato de Fisher bidirecional. Para análise de correlação foi utilizado o teste de Pearson. Análises de regressão foram utilizadas para comparar o desempenho dos métodos em estudo.

Para estas análises foi considerado, como método de referência, o ensaio por fluorometria devido ao longo histórico de determinações os quais têm apresentado resultados consistentes e robustos no laboratório da FEPE.

A equação $y = ax + b$, representa nestes ensaios: **y**: valores das concentrações obtidas por espectrometria de massas; **a**: coeficiente angular; **x**: concentração pelo método fluorométrico (referência) e **b**: intercepto. O coeficiente r^2 , caracteriza o valor da correlação em todos os ensaios.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS

Na Tabela 2 estão apresentadas as características das amostras de acordo com o gênero, etnia, e peso dos recém-nascidos avaliados. O gênero e a etnia foram tomados aleatoriamente, porém, o peso e a idade da criança, para os grupos G1 a G5, assim como o tempo da coleta foram fatores imprescindíveis para a formação dos grupos em estudo.

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS NOS DIFERENTES GRUPOS

PARÂMETROS	TOTAL (n = 528)	G1 (n = 108)	G2 (n = 84)	G3 (n = 84)	G4 (n = 49)	G5 (n = 80)	G6 (n = 123)
Gênero (%)							
M	47,2	42,9	47	47	56	50,5	45,5
F	52,8	57,1	53	53	44	49,4	54,5
Etnia (%)							
Euro	86,6	87,9	79,8	79,8	89,8	96,3	-
Afro	13,4	12,1	20,2	20,2	10,2	3,7	-
Idade (dias G1 a G5)							
Idade (anos G6)							
M	7,35	2,38	1,27	12,59	10,95	10,52	9,19
DP	16,36	1,05	0,42	14,07	18,56	34,50	7,90
Md	2,33	2,05	1,28	8,64	5,81	2,10	8,62
Peso (kg)							
M	3,10	3,41	3,25		2,07	3,12	
DP	0,66	0,46	0,46		0,42	0,64	
Md	3,14	3,37	3,2	-	2,20	3,09	-

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Gênero (Sexo); Euro = europeu; Afro = afrodescendente; Idade (G1 a G5) em dias; Idade G6 em anos; M = média; DP = desvio padrão; Md = mediana.

4.1.1 Análise da estabilidade da FAL em tempo "zero", 24, 48 e 72h em amostras mantidas à 37°C

Amostra de uma única fonte foi analisada em duplicata e demonstrado, na Figura 20, as concentrações de fenilalanina quando foi submetida a uma temperatura constante de 37°C. A determinação da FAL foi realizada em tempo "zero" e após 24, 48 e 72h avaliando-se, assim, a estabilidade do analito nestas circunstâncias.

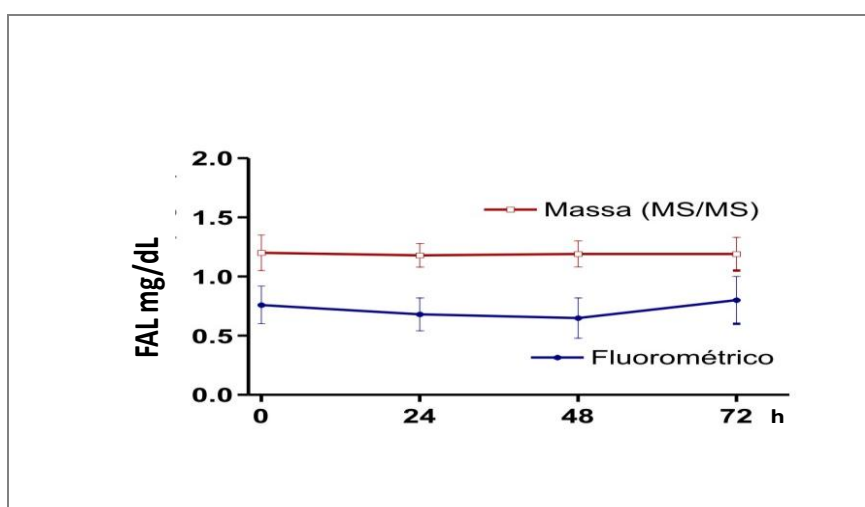


FIGURA 20 - CONCENTRAÇÕES DE FENILALANINA NOS TEMPOS "ZERO" E APÓS 24, 48 E 72H EM AMOSTRA MANTIDA À 37°C

FONTE: O autor (2011)

NOTA: X = Tempo em horas; Y = Concentração de fenilalanina mg/dL; DP = Desvio padrão para fluorometria e espectrometria de massas.

4.1.2 Análise da variabilidade analítica interensaio

Uma mesma amostra foi submetida a um ensaio de repetibilidade, 20 vezes consecutivas, nos métodos fluorométrico e de espectrometria de massas. Obtiveram-se resultados mostrando a variabilidade analítica ocorrida em cada método os quais estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 - ANÁLISE DA VARIABILIDADE ANALÍTICA INTERENSAIO PARA A FENILALANINA NOS MÉTODOS DE FLUOROMETRIA E DE ESPECTOMETRIA DE MASSAS

N.º DE REPETIÇÕES	FAL mg/dL (F)	FAL mg/dL (MS/MS)	TIR mg/dL (MS/MS)
1	0,69	1,37	1,39
2	0,81	1,26	0,86
3	0,65	1,21	1,22
4	0,52	1,45	0,97
5	0,43	1,11	0,96
6	0,57	1,26	1,70
7	0,60	1,04	1,21
8	0,79	1,14	0,85
9	0,98	1,34	0,93
10	0,62	0,78	0,81
11	0,49	1,45	1,05
12	0,70	1,20	0,84
13	0,57	1,20	1,27
14	0,76	1,31	0,90
15	0,91	1,24	1,24
16	0,70	1,30	0,91
17	0,68	1,15	1,41
18	1,07	1,26	1,15
19	0,69	1,19	1,01
20	0,65	1,37	1,12
Média	0,69	1,23	1,09
Mediana	0,68	1,24	1,03
A-V	0,43-1,07	0,78-1,45	0,81-1,69
DP	0,160	0,151	0,232
CV (%)	23,1	12,3	21,3

FONTE: O autor (2011)

NOTA: F= método fluorométrico; MS/MS= método de espectrometria de massas; AV= Amplitude de variação; DP=desvio padrão; CV= coeficiente de variação.

4.1.3 Análise dos resultados para a fenilalanina nos grupos avaliados utilizando-se os métodos de fluorometria automatizada e de espectrometria de massas em *tandem* não derivatizado

TABELA 4 - MÉDIA, DP E MEDIANA DOS VALORES DE FAL AVALIADOS NOS DIFERENTES GRUPOS PELOS MÉTODOS DE FLUOROMETRIA E ESPECTOMETRIA DE MASSAS, E DE TIR E RELAÇÃO FAL/TIR AVALIADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

PARÂMETROS/GRUPOS	TOTAL= 528	G1=108	G2=84	G3=84	G4=49	G5=80	G6=123
FAL mg/dL (F)							
M	2,69	0,87	0,94	0,67	0,70	2,21	8,57
DP	4,03	0,38	0,26	0,22	0,29	0,16	5,44
Md	0,95	0,80	0,94	0,68	0,69	2,21	8,02
FALmg/dL(MS/MS)							
M	3,66	1,56	1,54	1,21	1,23	2,21	11,72
DP	5,35	0,52	0,36	0,32	0,33	1,05	7,08
Md	1,53	1,45	1,53	1,16	1,17	1,74	11,28
TIRmg/dL (MS/MS)							
M	2,17	2,19	2,24	2,48	1,85	3,74	0,95
DP	2,42	1,64	1,02	0,89	0,89	5,43	0,51
Md	1,80	1,89	2,05	2,32	1,53	2,45	0,85
FAL/TIR (MS/MS)							
M	4,48	0,98	0,84	0,59	0,86	2,16	17,60
DP	10,24	0,87	0,32	0,23	0,40	1,02	16,27
Md	0,87	0,90	0,82	0,54	0,79	1,50	14,82

FONTE: O autor (2011)

NOTA: M = Média; DP = Desvio Padrão; F = Método Fluorométrico; Md = Mediana; MS/MS = Método de Espectrometria de Massas; FAL=Fenilalanina; TIR=Tirosina; FAL/TIR=Relação Fenilalanina/Tirosina.

- a) Comparação da concentração de fenilalanina por fluorometria e por espectrometria de massas utilizando o Teste t Student e o coeficiente de correlação de Pearson

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DE RESULTADOS DA FAL POR FLUOROMETRIA E POR MS/MS UTILIZANDO O TESTE t STUDENT E A CORRELAÇÃO DE PEARSON

GRUPOS	DETERMINAÇÕES		ESTATÍSTICA	
	FAL (F)	FAL (MS/MS)	p (teste t Student)	r (Correlação Pearson)
1	0,87 ± 0,38	1,56 ± 0,52	< 0,001	0,623 (< 0,001)
2	0,94 ± 0,26	1,54 ± 0,36	< 0,001	0,161 (< 0,001)
3	0,67 ± 0,22	1,21 ± 0,32	< 0,001	0,089 (0,003)
4	0,70 ± 0,29	1,23 ± 0,33	< 0,001	0,343 (< 0,001)
5	2,21 ± 0,16	2,21 ± 1,05	0,960	0,008 (0,423)
6	8,57 ± 5,44	11,72 ± 7,08	< 0,001	0,784 (< 0,001)

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Valor de "p" para Teste t Student para amostras pareadas bimodal.; r = coeficiente de correlação de Pearson (valor de "p" para a correlação).

- b) Análises de regressão

As análises de regressão para os grupos em estudo e o total das amostras encontram-se descritas na Tabela 6 e demonstradas nas Figuras 21 a 27.

TABELA 6 - SUMÁRIO DAS ANÁLISES DE REGRESSÃO PARA AS AMOSTRAS EM ESTUDO

GRUPOS	EQUAÇÃO (y = ax+b)	r ²
1	y = 1,08x + 0,612	0,625
2	y = 0,558x + 1,017	0,164
3	y = 0,427x + 0,922	0,087
4	y = 0,663x + 0,771	0,338
5	y = 0,578x + 0,938	0,008
6	y = 1,152x + 1,185	0,784
TOTAL	y = 1,262x + 0,362	0,901

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Y = FAL mg/dL (MS/MS); X = FAL mg/dL (F); r²=coeficiente de correlação;
Total = amostra completa.

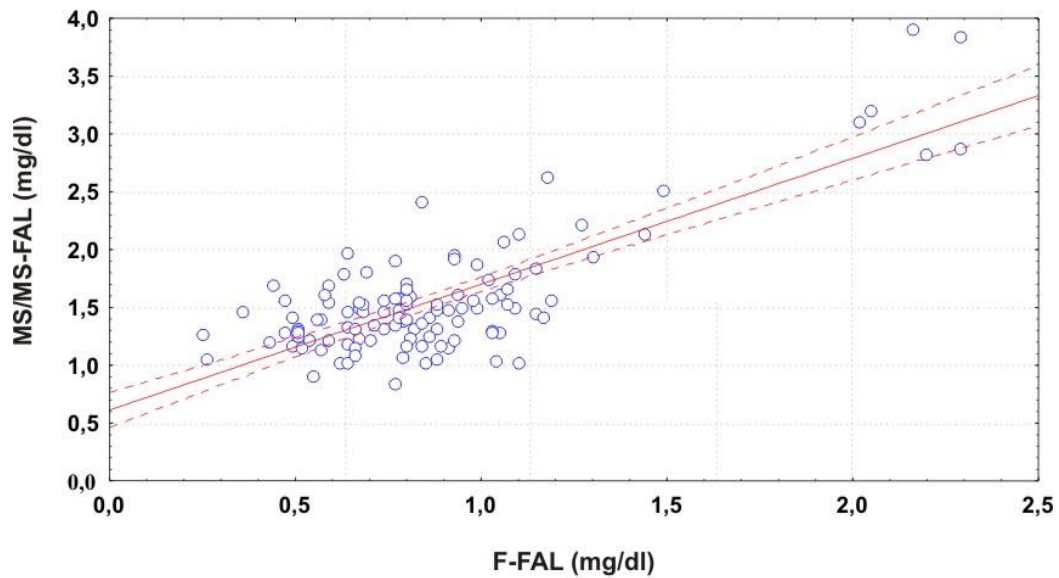


FIGURA 21 - ANÁLISE DE REGRESSÃO PARA O GRUPO CONTROLE (G1)

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Análise de regressão para as amostras pertencentes ao grupo controle (G1). A equação da reta observada foi $y=1,08x + 0,612$; $r^2=0,625$. F-FAL representa a concentração de fenilalanina (mg/dL) medida por método fluorométrico e MS/MS-FAL, o mesmo analito (mg/dL) quantificado por espectrometria de massas.

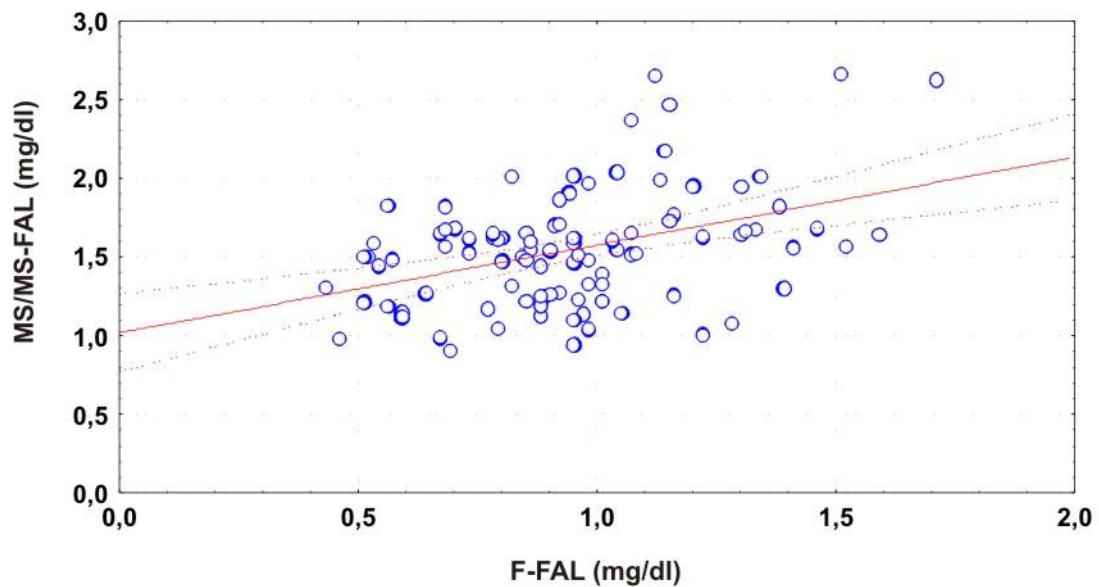


FIGURA 22 - ANÁLISE DE REGRESSÃO GRUPO COLETA PRECOCE (G2)

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Análise de regressão para as amostras pertencentes ao grupo coleta precoce (G2). A equação da reta observada foi $y=0,558x + 1,017$; $r^2=0,164$. F-FAL representa a concentração de fenilalanina (mg/dL) medida por método fluorométrico e MS/MS-FAL, o mesmo analito (mg/dL) quantificado por espectrometria de massas.

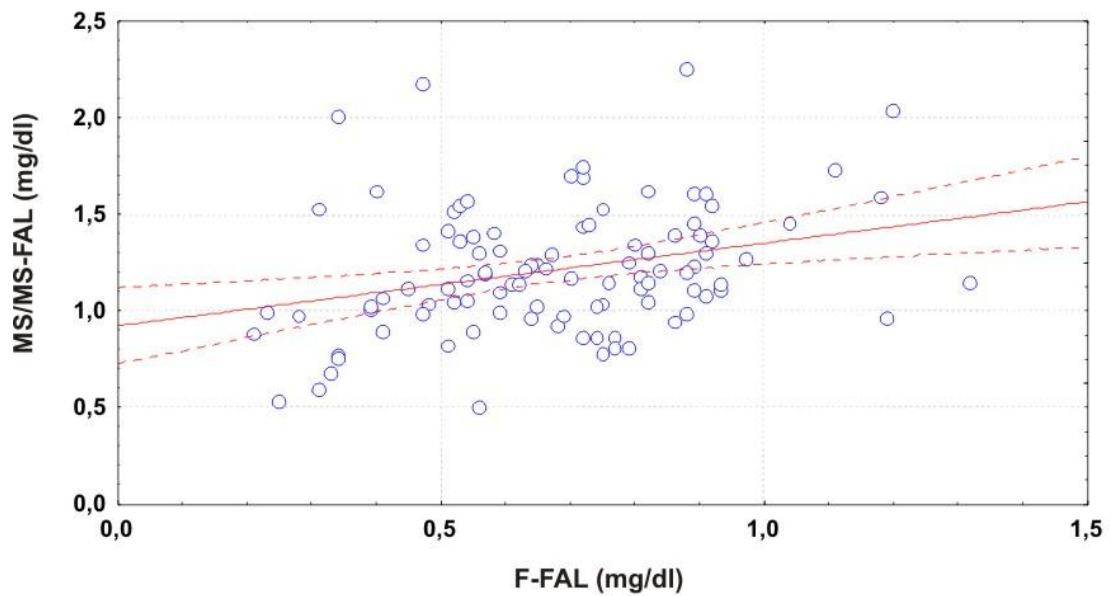


FIGURA 23 - ANÁLISE DE REGRESSÃO GRUPO 2.^a COLETA (G3)

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Análise de regressão para as amostras pertencentes ao grupo 2.^a coleta (G3). A equação da reta observada foi $y=0,427x + 0,922$; $r^2=0,087$. F-FAL representa a concentração de fenilalanina (mg/dL) medida por método fluorométrico e MS/MS-FAL, o mesmo analito (mg/dL) quantificado por espectrometria de massas.

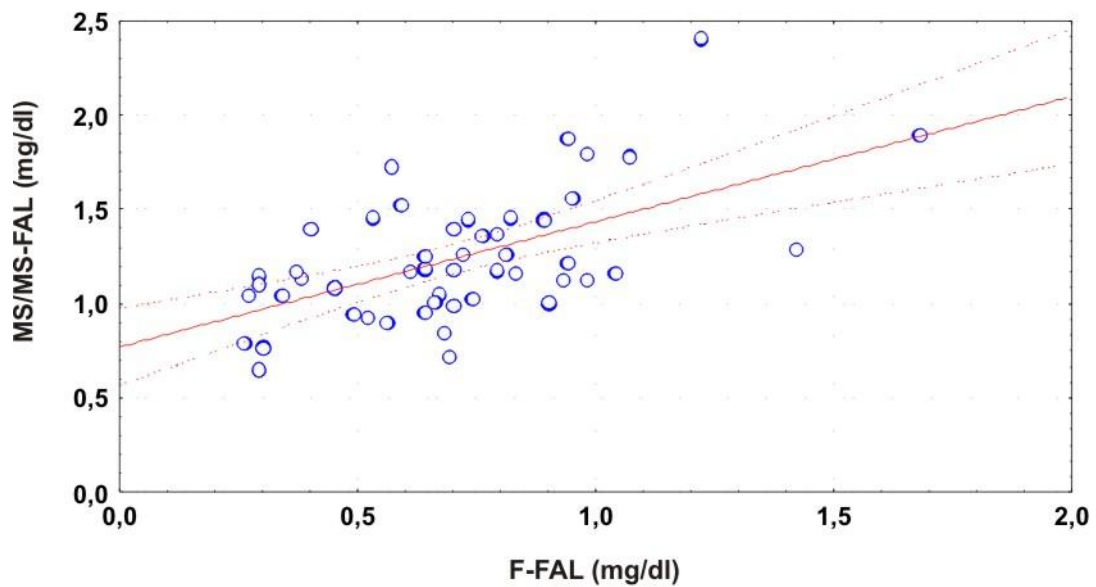


FIGURA 24 - ANÁLISE DE REGRESSÃO GRUPO BAIXO PESO (G4)

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Análise de regressão para as amostras pertencentes ao grupo baixo peso (G4). A equação da reta observada foi $y=0,663x + 0,771$; $r^2=0,338$. F-FAL representa a concentração de fenilalanina (mg/dL) medida por método fluorométrico e MS/MS-FAL, o mesmo analito (mg/dL) quantificado por espectrometria de massas.

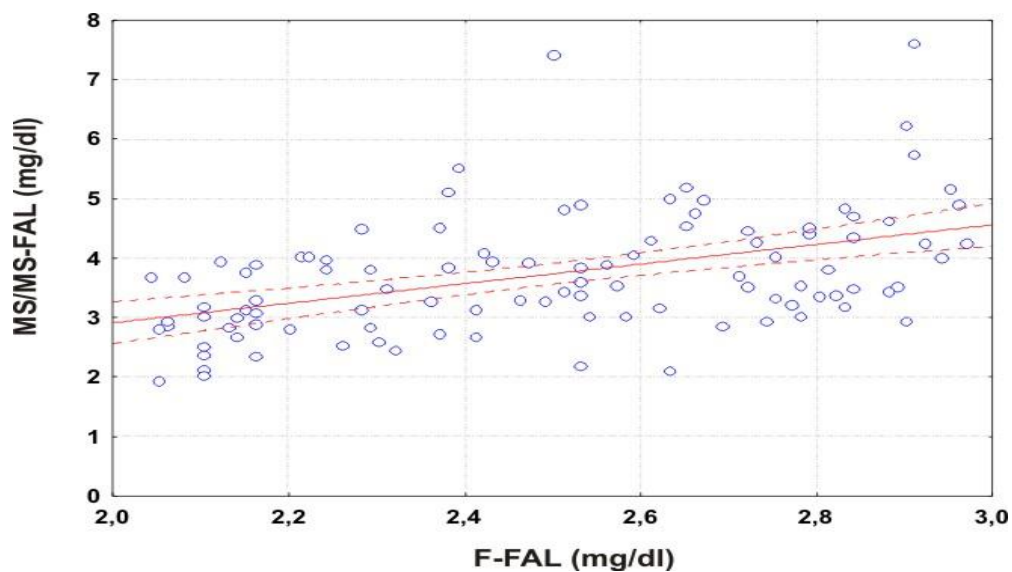


FIGURA 25 - ANÁLISE DE REGRESSÃO GRUPO LÍMITROFE (G5)

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Análise de regressão para as amostras pertencentes ao grupo limítrofe (G5). A equação da reta observada foi $y = 0,578x + 0,938$; $r^2 = 0,008$. F-FAL representa a concentração de fenilalanina (mg/dL) medida por método fluorométrico e MS/MS-FAL, o mesmo analito (mg/dL) quantificado por espectrometria de massas.

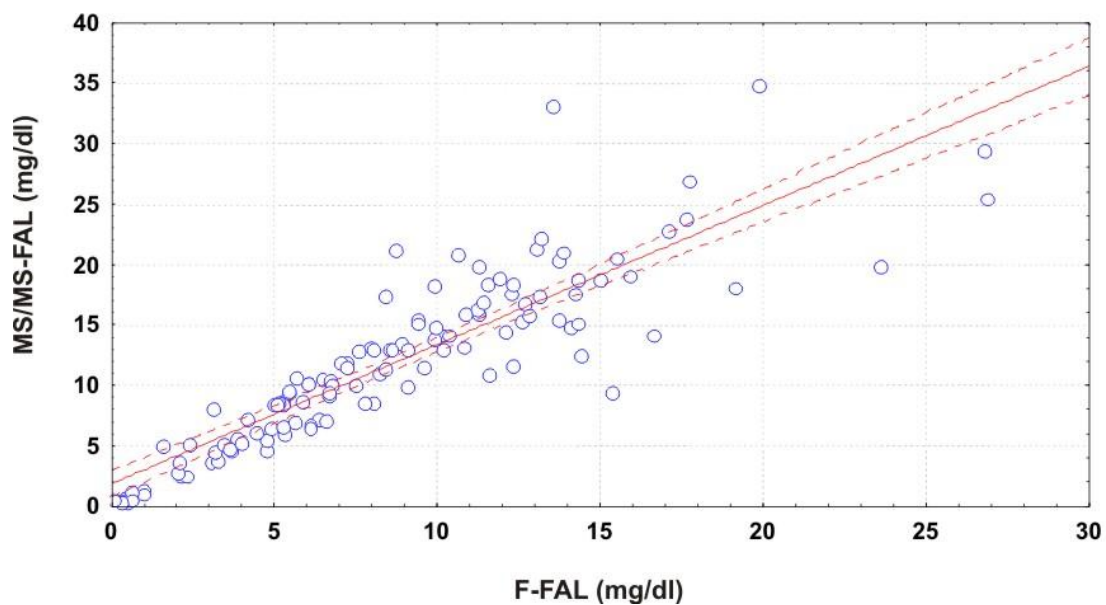


FIGURA 26 - ANÁLISE DE REGRESSÃO DO GRUPO FNC (G 6)

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Análise de regressão para as amostras pertencentes ao grupo FNC (G6). A equação da reta observada foi $y = 1,152x + 1,185$; $r^2 = 0,782$. F-FAL representa a concentração de fenilalanina (mg/dL) medida por método fluorométrico e MS/MS-FAL, o mesmo analito (mg/dL) quantificado por espectrometria de massas.

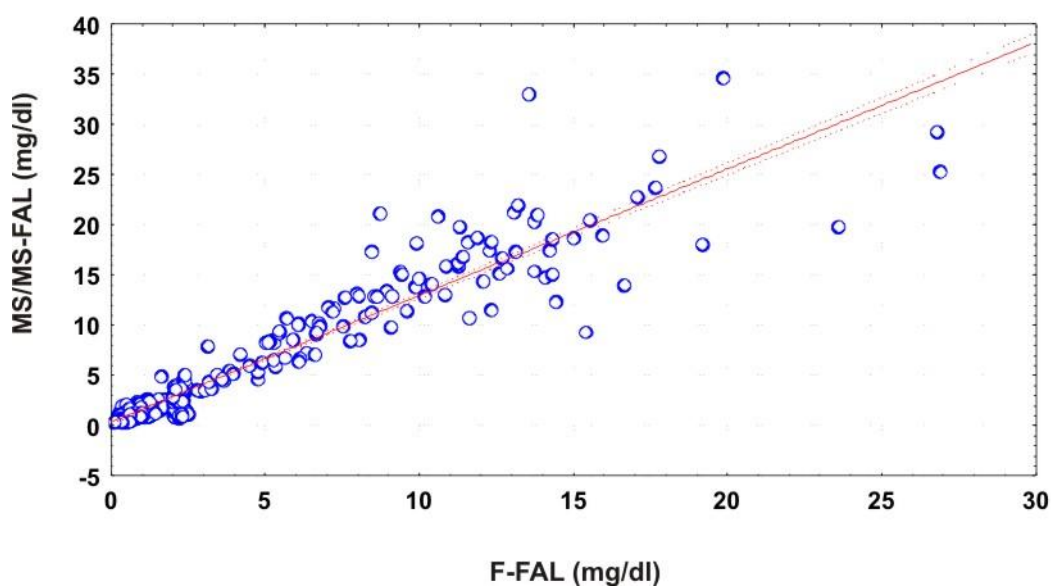


FIGURA 27 - ANÁLISE DE REGRESSÃO DA AMOSTRA TOTAL

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Análise de regressão para o total de amostras.. A equação da reta observada foi $y = 1,262x + 0,362$; $r^2 = 0,901$. F-FAL representa a concentração de fenilalanina (mg/dL) medida por método fluorométrico e MS/MS-FAL o mesmo analito (mg/dL) quantificado por espectrometria de massas.

4.1.4 Análise da concentração de FAL por fluorometria e por espectrometria de massas para os grupos: controle, limítrofe e indivíduos com FNC

TABELA 7 - ANÁLISE DOS RESULTADOS DA FENILALANINA POR FUOROMETRIA E POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA OS GRUPOS CONTROLE, LIMÍTROFE E FNC, E DA RELAÇÃO/FAL/TIR

PARÂMETROS	GRUPOS			p
	Controle	Limítrofe	FNC	
FAL(mg/dL) - Fluorométrico	$0,87 \pm 0,38$ 0,80[0,2-2,1]	$2,49 \pm 0,30$ 2,51[2,5-2,9]	$9,32 \pm 5,05$ 8,52[3,0-27]	<0,001
FAL(mg/dL) – MS/MS	$1,32 \pm 0,45$ 1,23[0,7-3,3]	$3,73 \pm 1,02$ 3,56[1,9-3,5]	$10,83 \pm 5,51$ 10,0[2,9-29]	
FAL/TIR (MS/MS)	$0,84 \pm 0,33$ 0,82[0,2-1,8]	$2,16 \pm 1,02$ 1,50[0,5-2,7]	$18,37 \pm 5,3$ 15,2[1,9-114]	<0,001

FONTE: O autor (2011)

NOTA: FAL= concentração de fenilalanina pelos métodos fluorométrico e espectrometria de massas (MS/MS). Razão FAL/TIR=obtida com o método espectrométrico (MS/MS). Os valores apresentados para os ensaios laboratoriais representam a média \pm 1-desvio padrão e a mediana [mínimo – máximo]. Valores de probabilidade obtidos por ANOVA corrigidos pelo Teste de Tukey. *probabilidade para o teste exato de Fisher bidirecional.

4.1.5 Concentração da fenilalanina frente aos valores de corte dos PCDTs de 2002 e de 2010 do Ministério da Saúde

A Figura 28 mostra os resultados da análise da fenilalanina dos grupos controle, limítrofe e pacientes FNC, quantificados pelos métodos em estudo, frente aos valores de corte das diretrizes brasileiras (PCDT) para o diagnóstico da FNC.

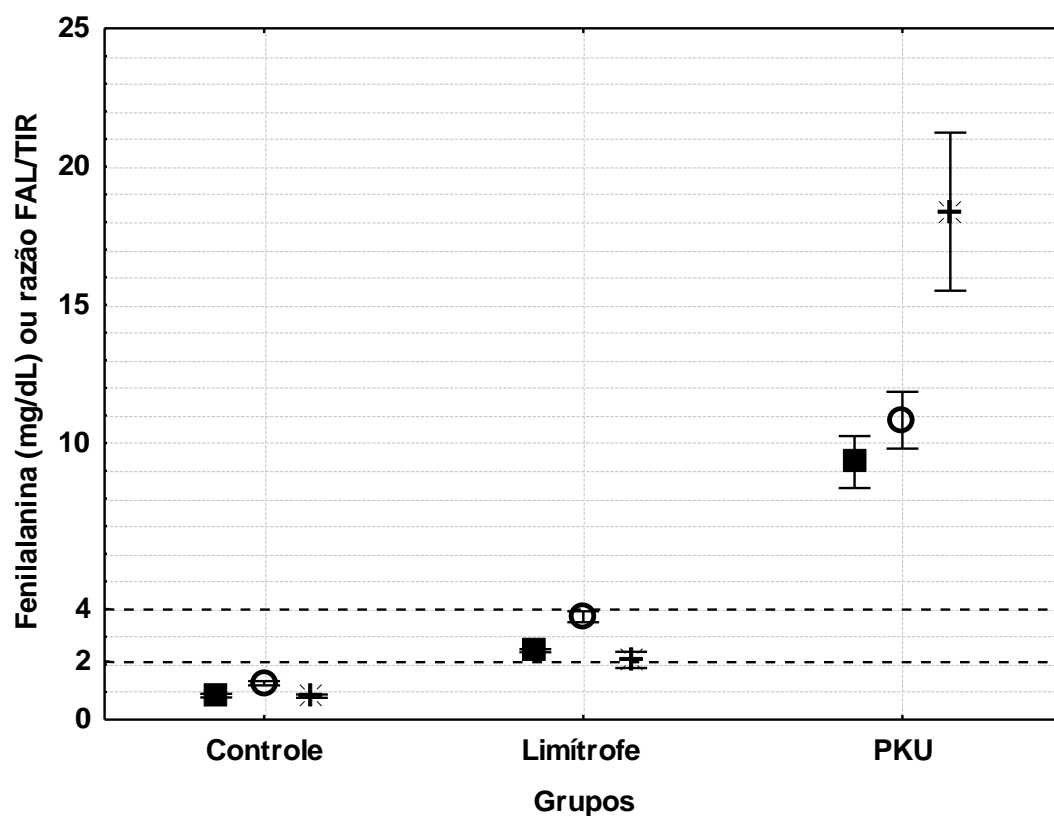


FIGURA 28 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE FENILALANINA (FAL) E DA RAZÃO FENILALANINA/TIROSINA (FAL/TIR) NOS GRUPOS EM ESTUDO

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Os símbolos representam a concentração média de fenilalanina em mg/dL com os métodos fluorométrico (quadrados cheios) e de espectrometria de massas (círculos abertos) ou a relação fenilalanina/tirosina obtida no método por espectrometria de massas (asterisco). As barras verticais indicam o intervalo de confiança de 95% para a média. As linhas tracejadas destacam as concentrações de 4,0 mg/dL e 2,0 mg/dL (que são os valores de corte preconizados para indivíduos saudáveis), pelas portarias do Ministério da Saúde de 2002 e 2010, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS

A proporção de recém-nascidos do sexo masculino para os do gênero feminino apresentou um percentual de 45 homens/55 mulheres em quase todos os grupos. Houve exceção nos grupos 4 e 5 onde o número de indivíduos do gênero masculino superou aos do gênero feminino. Cabe mencionar que os grupos das amostras foram selecionados aleatoriamente quanto à este parâmetro, pois a prioridade do estudo foi: o tempo de coleta e os resultados previamente obtidos pelo método fluorométrico. Entretanto, para o grupo 6 (FNC) ocorreu uma predominância real de pacientes, do gênero feminino em relação ao masculino, entre os indivíduos em seguimento clínico no período de 2008 a 2009, de aproximadamente 12%.

Igualmente, as amostras foram selecionadas sem priorizar diferenças étnicas, mas como era esperado, devido ao alto índice de imigração europeia no Estado do Paraná, cerca de 87% dos indivíduos participantes deste estudo eram caucasianos.

No grupo "controle" onde houve a seleção de amostras coletadas após 48h de vida, a média situou-se em 2,38 dias ou, aproximadamente, 57 horas após o nascimento e geralmente no momento da alta hospitalar.

No grupo "coleta precoce", a média situou-se em 1,27 dias ou aproximadamente 30 horas de vida.

No grupo "2.^a coleta" a média situou-se em 12,59 dias ou aproximadamente 302 horas de vida. Lembrando o que foi citado anteriormente, este grupo compõem-se dos mesmos recém-nascidos em que ocorreu a coleta precoce, porém, neste momento, numa 2.^a coleta.

No grupo "baixo peso" o tempo de coleta situou-se em 10,95 dias ou aproximadamente, 263 horas de vida. O atraso no tempo da coleta deste grupo, provavelmente, deve-se ao fato de que sejam recém-nascidos prematuros e, portanto, submetidos nos primeiros dias de vida a cuidados médicos em internamento hospitalar.

O grupo "limítrofe" teve seu período de coleta em média em 10,52 dias ou aproximadamente 252 horas de vida. A justificativa para o atraso na coleta deste grupo é de que, provavelmente, foi constituído por amostras de uma 2.^a coleta quando

foi solicitada a confirmação do resultado $\geq 2,5\text{mg/dL}$ (protocolo da FEPE). Estas amostras quando ensaiadas no espectrômetro de massas, cuja metodologia e sensibilidade diferem do fluorométrico, apresentaram valores maiores, o que será discutido na sequência.

Para o grupo "pacientes FNC" a média de 9,19 refere-se à quantificação em anos visto que, este grupo é composto por crianças de idades variadas, desde recém-nascidos até adolescentes.

A média do peso dos recém-nascidos cujas amostras foram utilizadas neste estudo situou-se em torno de 3kg, com exceção do grupo "baixo peso" em que este parâmetro situou-se em torno de 2kg.

Para o grupo "pacientes FNC" este parâmetro não foi analisado devido à variação das idades.

5.1.2 Estabilidade da FAL em tempo "zero", 24, 48 e 72h em amostra mantida à 37°C

Amostra de sangue coletada em papel filtro padronizado e seca à temperatura ambiente foi analisada por método fluorométrico e por espectrometria de massas para quantificar a estabilidade da fenilalanina. A primeira análise ocorreu no tempo "zero" e após, esta amostra foi submetida à temperatura de 37°C constante, por 3 dias consecutivos, sendo realizada a cada 24h, nova mensuração. O resultado está representado no gráfico 1 demonstrando que a fenilalanina se mantém estável mesmo em temperatura de 37°C por 3 dias consecutivos.

Este experimento objetivou a avaliação da estabilidade da fenilalanina mediante variações de temperatura que possam ocorrer, principalmente nos meses de verão, desde o momento da coleta e durante o transporte das cidades do interior do Paraná à central dos correios em Curitiba, até a chegada da amostra no Laboratório da FEPE.

Estes resultados estão em conformidade com a literatura (CHACE *et al.*, 1998) que relatam em seus experimentos que *strips* de amostras de sangue seco, com dessecante, foram empacotadas em plásticos fechados tipo *zip*. Estas amostras foram mantidas no escuro e submetidas à variação de temperatura: ambiente, a 37°C, a -4°C e a -20°C. Após 30 dias estas amostras foram reanalisadas em

duplicata por método HPLC e analisadas estatisticamente. O resultado de maior interesse para este estudo é de que a FAL reteve 83-85% da sua concentração inicial após 30 dias em temperatura à 37°C.

Observou-se neste experimento que os resultados para a fenilalanina obtidos por espectrometria de massas apresentam-se cerca de 0,7mg/dL elevados em relação aos resultados pela análise fluorométrica.

5.1.3 Variabilidade analítica interensaio

Um total de 20 repetições com mesma amostra, foi analisado em ambos os métodos, fluorométrico e de espectrometria de massas, a um ensaio de imprecisão analítica ou repetibilidade (Tabela 3).

Quando comparados os coeficientes de variação analítica (CVA), o método fluorométrico mostrou variação cerca de duas vezes maior que o espectrométrico (23,1% vs 12,3%, respectivamente). Neste contexto, a espectrometria de massas realizada, como descrito neste trabalho, mostrou características analíticas superiores ao ensaio fluorométrico. Os resultados observados são similares aos descritos por Ceglarek (CEGLAREK *et al.*, 2002).

5.1.4 Análise dos resultados quanto à concentração de FAL pelos métodos fluorométrico e de espectrometria de massas

Quando as concentrações de FAL foram comparadas nos grupos entre os dois métodos em estudo, sistematicamente o método espectrométrico apresentou valores significativamente superiores ($p < 0,05$), exceto para o grupo 5 (Tabelas 4 e 5).

Considerando o método fluorométrico como referência (100%), as concentrações de FAL foram significativamente superiores, sendo 79% (1,56/0,87), 64% (1,54/0,94), 81% (1,21/0,67), 76% (1,23/0,70), 0% (2,21/2,21) e 37% (11,72/8,57), respectivamente para os grupos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, quando comparado ao método por espectrometria de massas (Tabelas 4 e 5).

Observa-se que as concentrações de FAL no grupo em que a coleta ocorreu antes de 48h de vida, apresentam-se maiores do que no grupo 1 (controle) em que a coleta foi realizada após 48h de vida do recém-nascido com alimentação láctea já estabelecida e, portanto, com aporte suficiente de fenilalanina.

Este achado contraria a expectativa em relação à concentração de FAL e a ingesta proteica quando se entende que a quantidade de FAL após 48h de vida deveria ser maior (mesmo dentro dos parâmetros de normalidade) que a da coleta precoce. Entretanto, de acordo com John A. Arnopp e colaboradores, amostras de sangue de recém-nascidos do programa de triagem neonatal da Califórnia coletadas nas primeiras 2 horas após o nascimento e analisadas por método fluorométrico, apresentam uma média de 2,75mg/dL de FAL. Após 7-9h a concentração aumentou rapidamente para 3,06mg/dL diminuindo lentamente para 2,73mg/dL até 24h de vida. Nos bebês cujas as coletas ocorreram após as 24h de vida, a média da concentração da FAL situou-se em 2,66mg/dL. O aumento de FAL logo após o nascimento é interpretado como consequência do trauma tissular pós-parto associado a um pequeno atraso no início da atividade da FAH (ARNOPP *et al.*, 1995).

Para o grupo 4 (baixo peso), a coleta foi realizada após 48h de vida, porém, a probabilidade de prematuridade é bastante grande devido ao peso inferior ou igual a 2,2kg. A média situou-se em 0,70mg/dL e 1,23mg/dL, respectivamente. Neste grupo, pretendeu-se avaliar o metabolismo da fenilalanina numa situação de provável prematuridade. As amostras dos indivíduos do grupo 5 (limítrofe) apresentaram comportamento diferente dos demais grupos (Tabela 5). Neste grupo quando comparados os dois métodos em estudo as concentrações de FAL foram similares ($p = 0,96$) e baixa correlação linear foi observada ($r^2 = 0,008$). É relevante mencionar que a dispersão dos resultados medida pelo desvio padrão foi cerca de 6 vezes superior no método espectrométrico quando comparado ao fluorométrico (1,05 vs 0,16, respectivamente). Novos estudos serão necessários para buscar as causas do comportamento diferente deste grupo em relação aos demais. Pode-se postular que interferentes analíticos estariam presentes nestas amostras promovendo respostas analíticas diferentes nos métodos em estudo. Entretanto, não se tem conhecimento, na literatura, de comportamento analítico similar quando analisados valores de fenilalanina entre 2,1 e 2,9mg/dL pelos métodos fluorométrico e de espectrometria de massas não derivatizada.

Para o grupo 6 (pacientes fenilcetonúricos), a média da concentração de FAL para o método fluorométrico situou-se em 8,57mg/dL e para o método espectrométrico em 11,72mg/dL.

A média dos valores de TIR obtida por espectrometria de massas situou-se, para todos os grupos em 2,17mg/dL, ou seja, dentro da normalidade (o valor normal é até 4,0mg/dL) (CAMARGO NETO *et al.*, 1998).

Os valores da relação FAL/TIR apresentaram-se menor que 1,0 para todos os grupos com exceção do grupo FNC cuja a média da relação FAL/TIR foi de 17,6, com uma mediana de 14,82, comprovando que em indivíduos normais para a fenilalanina, a relação FAL/TIR apresenta-se abaixo de 3 (PCDT, 2010). Os níveis de TIR para o grupo 6 situaram-se, na média de 0,95 e mediana de 0,85. Valores de tirosina mais elevados eram esperados neste grupo, pois estes indivíduos recebem fórmula especial para a reposição deste aminoácido, que não foi obtido pela hidroxilação da fenilalanina.

A concentração de FAL, significativamente maior apresentada pelo método de espectrometria de massas e observada neste estudo, contrasta com outras publicações onde a metodologia de massas fornece resultados inferiores quando comparado a ensaios fluorescentes (CHACE *et al.*, 1993; CEGLAREK *et al.*, 2002) Este resultado é esperado, uma vez que a espectrometria de massas não apresenta as interferências positivas, inerentes ao método fluorométrico, de outros compostos presentes na análise. No entanto, nos estudos que apresentaram esta característica, o método de espectrometria de massas foi sempre o derivatizado.

A metodologia de espectrometria de massas empregada neste trabalho foi a de diluição isotópica por método não derivatizado. Neste contexto, o fabricante do reagente (*NeoGram®*, PerkinElmer) descreve que esta metodologia apresenta, em determinadas concentrações, valores mais altos de FAL quando comparado ao ensaio fluorométrico e flutuações analíticas em ambos os métodos (Figura 1). Como fator responsável por esta característica do MS/MS, aponta-se a elevada recuperação da FAL em amostra de papel filtro. Confirmam os nossos resultados, estudo piloto com mais de 800 amostras realizados pela FEPE de Curitiba (dados não publicados) aonde se observaram diferenças metodológicas similares às reportadas neste estudo.

Também reforçam a consistência dos dados apresentados, o fato de ambos os métodos em estudo (massas e fluorométrico) apresentarem resultados adequados em programas de controle de qualidade externo internacional do qual a FEPE de

Curitiba participa (CDC, Atlanta). A consistência observada nos programas de qualidade externos também eliminam possíveis dúvidas sobre a qualidade da calibração dos ensaios. Os resultados obtidos pelos métodos fluorométrico e de espectrometria de massas no CDC de Atlanta estão apresentados no Anexo 7.

5.1.5 Análises de regressão

As análises de regressão comparam o desempenho dos métodos em estudo e suas relações (Tabela 6 e Figuras de 2 a 7). A equação de regressão $y=ax + b$; "x" e "y" são os valores de FAL (mg/dL) pelos métodos fluorométrico (tomado como referência) e espectrométrico respectivamente; "a" o ângulo de inclinação da reta (erro proporcional); e "b", o intercepto (erro constante ou sistemático).

Os métodos apresentaram comportamento significativamente diferente conforme o grupo em que a comparação foi realizada.

Em uma população saudável (grupo 1), com cerca de 90% dos resultados entre 0,5 e 1,5mg/dL, o método espectrométrico apresentou um erro proporcional de 8% ($a = 1,08$) e um erro constante (intercepto) de 0,62mg/dL (Figura 21).

A análise de regressão para o grupo 2 (coleta precoce) mostrou um padrão de regressão diferente quando comparado ao grupo controle (Figura 22). Um erro constante de 1,0mg/dL foi associado a uma inclinação de 0,558 ("a").

A comparação entre os métodos nos grupos 3 e 4 mostrou padrões similares (Figuras 23 e 24).

O grupo 5 (limítrofe) embora tenha apresentado uma equação da regressão linear semelhante àquela observada entre os métodos para os grupos 3 e 4, evidenciou uma elevada dispersão dos resultados como observado na Figura 25. Estes pacientes poderiam estar apresentando, na amostra de sangue, fatores interferentes que propiciaram esta dispersão. Não é impossível descartar que erros analíticos ou mesmo pré-analíticos possam ter contribuído para este comportamento dissonante. No entanto, não foi possível identificar as fontes desta variação, caso elas tenham ocorrido.

O grupo 6, denominado FNC, foi constituído por amostras de pacientes que estavam em acompanhamento clínico no setor de Endocrinologia Pediátrica do

Hospital de Clínicas (HC) – UFPR. Todos os pacientes tiveram o diagnóstico de FNC confirmado por repetições subsequentes da determinação da concentração de FAL por método fluorométrico.

Para os valores de FAL elevados, como os observados no grupo 6, o comportamento dos métodos foi similar ao observado no grupo controle. A correlação entre os métodos foi superior a 78% com erros sistemáticos de 15% ($a = 1,152$) e erro constante de 1,18mg/dL. A correlação para o total de amostras foi de 90% ($r^2 = 0,901$).

Analisando em conjunto, os grupos em estudo mostraram correlação linear muito baixa, exceto para os grupos 1 e 5 (Tabela 6). Este achado foi inesperado uma vez que relatos na literatura apontam para correlações em torno de 80 - 90% (0,80 – 0,90) entre os diferentes métodos (CHACE *et al.*, 1993; CEGLAREK *et al.*, 2002).

Chace e cols. (1998) e Ceglarek e cols. (2002), desenvolveram um estudo comparativo de métodos analíticos para a determinação da fenilalanina, Donald H Chace e cols (CHACE *et al.*, 1998), realizaram em 1998, na Califórnia, um estudo das respostas analíticas na triagem da FNC em recém-nascidos com menos de 24h de vida os quais tiveram, primeiramente, as amostras quantificadas por método fluorométrico. O tamanho amostral foi de 208 indivíduos. Estes indivíduos apresentaram, inicialmente, os resultados: inicial negativo; inicial positivo para HPA que negativaram na reconvocação e inicial positivo para HFA confirmado no seguimento clínico como FNC ou HFA variante.

O valor de corte (*cutoff*) da análise fluorométrica realizada com *kit in house* foi estabelecido em 258 μ mol/L (4,3mg/dL). Portanto, as amostras que apresentaram resultado da concentração de FAL $\geq 4,3$ mg/dL foram classificadas como positivas. O grupo classificado como HFA variante teve uma média de concentração de FAL de 430 μ mol/L (7,1mg/dL) e o grupo classificado como FNC clássica apresentou uma média de 1.188 μ mol/L (19,6mg/dL). Estas amostras foram numeradas e enviadas à Espectrometria de Massas Facilitada do Centro Médico Universitário, em Duke, para serem submetidas ao ensaio por espectrometria de massas. O valor de corte estabelecido para este ensaio foi baseado em parâmetros utilizados em estudo prévio (CHACE *et al.*, 1993). A correlação das análises para ambos os métodos foi 0,817. Todas as crianças com FNC clássica e HFA variante, foram detectadas quando utilizados valores de corte: 4,3mg/dL para o método fluorométrico e 3,0mg/dl para o método espectrométrico. Conforme descrito pelos autores, o ensaio por espectrometria de massas reduziu o número de falsos positivos resultantes do

método fluorométrico de 91 para 3 e ao ser realizada a quantificação da razão molar FAL/TIR ($FAL/TIR > 2,5$), o número de falsos positivos diminuiu de 3 para 1. Os autores ressaltam, ainda, que crianças afetadas apresentaram uma nítida tendência de aumento de FAL e da relação FAL/TIR já na coleta precoce (primeiras 24h de vida) (CHACE *et al.*, 1993). Este estudo além de demonstrar a sensibilidade e a acurácia do método espectrométrico, revelou a importância de se adequar os valores de corte para cada metodologia empregada visando alcançar melhor desempenho na análise das amostras. Ceglarek e cols. (2002), observaram em seu estudo com 300 amostras, a superioridade do MS/MS em relação ao método fluorométrico, em termos de reprodutibilidade e acurácia e a vantagem da determinação fenilalanina/tirosina no diagnóstico da fenilcetonúria. A correlação de Pearson entre os métodos foi de 91%. O estudo também mostrou que existe concordância entre a fluorometria e a espectrometria de massas até a média de concentração de $300\mu\text{m/L}$ ($\sim 4,95\text{mg/dL}$). À medida que a concentração de fenilalanina aumentou, a diferença dos resultados entre os métodos também sofreu aumento mostrando valores de concentração em torno de $96\mu\text{m/L}$ (aproximadamente $1,58\text{mg/dL}$) mais elevados no MS/MS em relação ao fluorométrico.

Não foram observados estudos publicados avaliando-se, especificamente, as metodologias deste estudo e avaliação da concentração de FAL em diferentes grupos de recém-natos.

Apresentam-se, como hipóteses não excludentes para explicar a baixa correlação observada, dois fatores. Primeiro, a quantificação da fenilalanina pelo método fluorométrico sofre influência da concentração de outros compostos na amostra em magnitude de 12-20% que condicionam uma interferência, produzindo um "ruído" analítico (McCAMAM; ROBINS, 1963). A quantificação da fenilalanina pelo método com espectrometria de massas não é afetada pela presença de outros compostos na amostra. Também, o método fluorométrico apresenta uma variação analítica de cerca de 20% (coeficiente de variação), o que é aceitável para a triagem neonatal, mas representa uma variação expressiva (PERKIN ELMER LIFE AND ANALYTICAL SCIENCES, W.O, 2007). Em síntese, as diferenças analíticas entre os métodos de espectrometria de massas e fluorométrico, este afetado por variações decorrentes de outros compostos interferentes e ampla variação analítica, podem ser os responsáveis pela expressiva redução da correlação metodológica observada. Quando a concentração de fenilalanina é elevada, como as observadas no grupo 6,

a variação analítica e o "ruído" do efeito dos interferentes são minimizados e os métodos apresentam boa correlação ($r^2=0,784$; Tabela 6). Novos estudos deverão ser conduzidos para confirmar a hipótese apresentada, com especial atenção ao controle das variáveis pré-analíticas, como a homogeneidade e a distribuição da concentração de sangue depositada em papel filtro.

5.1.6 Concentração de fenilalanina (FAL) e relação fenilalanina/tirosina (FAL/TIR) dos grupos controle, limítrofe e FNC frente aos valores de corte do PCDT de 2002 e 2010

Em 2010, o Ministério da Saúde implantou nova regulamentação abordando a triagem neonatal (BRASIL, 2010). Entre as alterações propostas nesta nova versão, está a significativa alteração do valor de corte para o diagnóstico da fenilcetonúria. O protocolo de 2002 propunha a suspeita de alteração na concentração da fenilalanina no sangue, quando os valores se situavam acima de 4,0mg/dL (BRASIL, 2002). O PCDT atual de 2010, recomenda concentrações superiores a 2,0mg/dL como valores indicativos de suspeita para HFA e reforçam a importância da relação fenilalanina/tirosina para o diagnóstico da FNC (Figura 28 e Anexo 2).

O presente estudo mostra que os novos valores de referência de 2,0mg/dL propostos na diretriz de 2010 do Ministério da Saúde são adequados para discriminar a maioria dos indivíduos saudáveis (Figura 28) porém, recém-nascidos que apresentaram valores de FAL entre 2,1 e 2,9mg/dL e que não são considerados suspeitos de FNC conforme o protocolo da FEPE, também não mostraram relação FAL/TIR significativa. A mediana da relação FAL/TIR para este grupo de recém-nascidos situou-se em 0,85.

A razão FAL/TIR menor que 3,0 parece ser adequada para discriminar indivíduos com valores limítrofes, daqueles com fenilcetonúria clássica (Figura 28) e caracteriza, com clareza, os resultados de FNC quando comparados às determinações de FAL pelos ensaios de fluorometria. Estes dados reforçam a superioridade da espectrometria de massas para a triagem neonatal como descrito em outros trabalhos (CHACE *et al.*, 1998; CEGLAREK *et al.*, 2002; CHACE; KALAS, 2005).

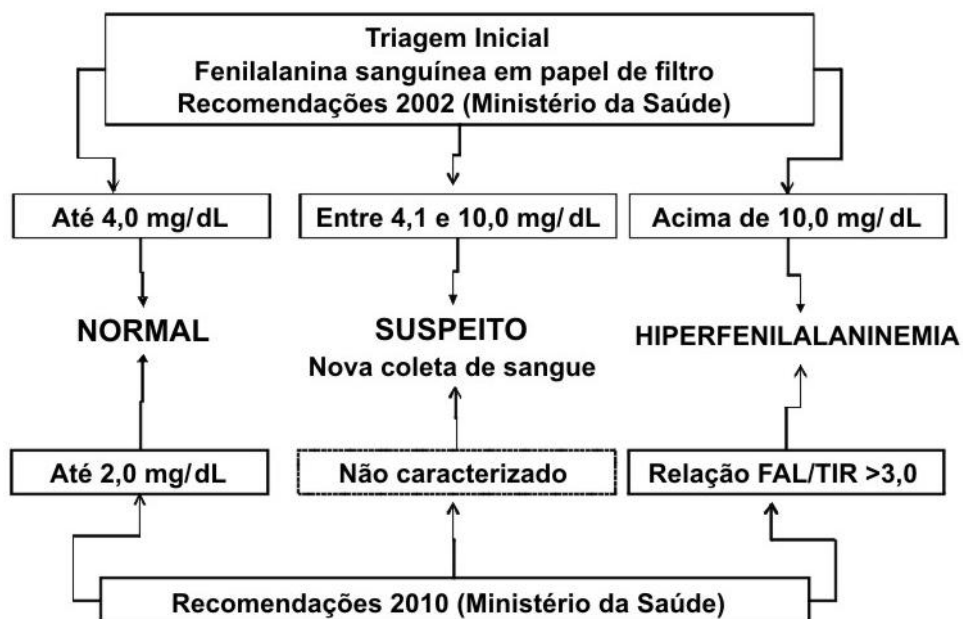


FIGURA 29 - FLUXOGRAMA PARA A CARACTERIZAÇÃO DA HIPERFENILALANINEMIA COMPARANDO OS VALORES DE CORTE RECOMENDADOS PELAS DIRETRIZES DE 2002 E 2010 DO MINISTÉRIO DA SAÚDE

NOTA: Desenho esquemático comparando o PCDT 2002 e o PCDT 2010.

A expressiva diferença entre os valores de corte para a caracterização da suspeita de hiperfenilalaninemia e fenilcetonúria entre as duas diretrizes do Ministério da Saúde sugere que, ao adotar a nova recomendação oficial (BRASIL, 2010), as frequências na detecção destas doenças possam ser alteradas, com possíveis reflexos em estudos epidemiológicos.

Vários Centros de Triagem Neonatal tomam por base, a longo tempo, um protocolo hierarquizado fundamentado nas diretrizes do MS de 2002, associado às recomendações internacionais e valores de corte sugeridos pelos fabricantes dos reagentes e equipamentos utilizados para a quantificação da fenilalanina em amostras de sangue seco. Este protocolo tem, até então, estabelecido uma diretriz unificada propiciando homogeneidade no tratamento das divergências e intercorrências analíticas na triagem da fenilcetonúria (Tabela 1). A concentração de fenilalanina obtida pelos métodos fluorométrico e espectrométrico em relação ao grupo 2 (limítrofe), acima de 2,0mg/dL (valor de corte do PCDT de 2010), sugere que os valores de corte deveriam ser ajustados à metodologia e aos parâmetros do *kit* utilizado no ensaio, evitando suspeita de falsos positivos e, conseqüentemente, novos ensaios ou novas coletas (que geram estresse familiar) para a confirmação de resultados. Ressalta-se, portanto, a relevância na revisão dos valores de "normalidade" para a concentração sanguínea de FAL em triagem neonatal. Entretanto, a redução em 50% destes valores

(4,0mg/dL para 2,0mg/dL) reflete sintonia com a necessidade de detecção precoce da hiperfenilalaninemia e da FCN concomitante ao emprego de metodologias avançadas com maior sensibilidade e especificidade.

Diante das vantagens do emprego da espectrometria de massas porque não implementá-la no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN)?

O PNTN preconiza, em conformidade com o *National Screening Committee* de 1998, que para uma doença estar inserida num programa de triagem populacional deve ser um problema importante de Saúde Pública e ter sua história natural bem entendida. O teste deve ser simples e barato e o tratamento efetivo a fim de melhorar a qualidade de vida do indivíduo afetado. As doenças mais frequentes detectadas pelo MS/MS, além da fenilcetonúria, são: tirosinemia tipo 1, Xarope de Bordo e MCAD (doença dos ácidos graxos de cadeia média). As demais são raras e, portanto, não estão em conformidade com a proposta do PNTN. Isto viria refletir no custo elevado do ensaio isolado para a FNC pelo MS/MS como mostra o estudo de Schoen e cols. (2002) e Carrol e Downs (2006) (SCHOEN *et al.*, 2002; CARROL; DOWNS, 2006). Calculando-se aproximadamente o custo (por teste e com base neste estudo, em termos de reagentes), a pesquisa direcionada apenas para a FNC, pelo método espectrométrico, seria em torno de 1000% mais elevado quando comparado ao custo pelo método fluorométrico.

6 CONCLUSÃO

- Os métodos fluorométrico (*Neonatal Phenylalanine® kit*, PerkinElmer) e por espectrometria de massas com diluição isotópica não derivatizado (*NeoGram® Amino Acids and Acylcarnitines Non-derivatized Tandem Mass Spectrometry Kit*, PerkinElmer) apresentaram valores diferentes, tendo o método espectrométrico apresentado valores significativamente superiores;
- A concentração de fenilalanina em amostras de recém-natos coletadas antes de 48 horas de vida e comparadas às coletadas após 48h do nascimento, não difere;
- Crianças com peso ($\leq 2,2$ kg) não apresentaram alterações nas concentrações de FAL quando comparadas ao grupo controle (peso $\geq 2,5$ kg);
- O grupo de amostras com valores de fenilalanina entre 2,1 e 2,9mg/dL (grupo limítrofe) apresentou mediana de 1,50 para a relação FAL/TIR;
- As respostas analíticas foram diferentes quanto à sensibilidade e especificidade das metodologias empregadas na dosagem de fenilalanina, indicando que os valores de normalidade devem ser adequados ao método utilizado na triagem neonatal;
- A quantificação da fenilalanina por espectrometria de massas apresentou uma imprecisão analítica menor ($\sim 12\%$) e a informação da relação fenilalanina/tirosina (FAL/TIR), quando comparado ao ensaio fluorométrico;
- A implementação da metodologia de espectrometria de massas na triagem neonatal da fenilcetonúria torna-se, atualmente, inviabilizada pelo alto custo.

REFERÊNCIAS

- ADAM, B. W.; ALEXANDER, J. R.; SMITH, S. J.; CHACE, D. H.; LOEBER, J. G.; ELVERS, L. H.; HANNON, W. H. Recoveries of phenylalanine from two sets of dried-blood-spot reference materials: prediction from hematocrit, spot volume, and paper matrix. **Clin Chem**, v.46, n.1, p.126-128, 2000.
- AMORIM, T.; GATTO, S. P. P.; BOA-SORTE, N.; LEITE, M. E. Q.; FONTES, M. I. M. M.; BARRETTO, J.; ACOSTA, A. X. Aspectos clínicos da fenilcetonúria em serviço de referência em triagem neonatal da Bahia. **Rev Bras Saúde Mater Infan**, v.5, n.4, p.457-462, 2005.
- ANASTASOAI, V.; KURZIUS, L.; FORBES, P.; WAISBREN, S. Stability of blood phenylalanine levels and IQ in children with phenylketonuria. **Mol Genet Metab**, v.95, n.1-2, p.17-20, 2008.
- ANTUNES, E. R. G.; ASSUNÇÃO, J. G.; COSTA, M. A.; SANTOS, E. C. Fenilcetonúria clássica com manifestação de dermatite pelagróide. **An Bras Dermatol**, v.65, n.1, p.31-35, 1990.
- ARNOPP, J. J.; LOREY, F. W.; CURRIER, R. J.; EASTMAN, J. W.; VELAZQUEZ, K. B.; MORALES, D. R.; CUNNINGHAM, G. C. Results of screening for phenylketonuria using a lower cutoff value in early collected specimens. **Screening**, v 3, n.4, p 93-199, 1995.
- BERNEGGER, C.; BLAU, N. High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1,919 patients observed from 1988 to 2002. **Mol Genet Metab**, v.77, n.4, p.304-313, 2002.
- BICKEL, H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. **Enzyme**, v.38, n.1-4, p.14-26, 1987.
- BLAU, N. Determination of phenylalanine in filter paper blood spots by a simplified automated fluorimetric method without dialysis. **Clin Chim Acta**, v.129, n.2, p.197-200, 1983.
- BLAU, N.; AWARD, H. B. **Tetrahydrobiopterin**: deficiency withouth hiperphenylalaninemia - Detection and characterization of sepiapterin reductase deficiency. 2001. Disponível em: <http://www.bh4.org/BH4_nblau_horstbickel_P2.asp>. Acesso em: 24 jun. 2009.

BLAU, N.; KOCH, R.; MATALON, R.; STEVENS, R. C. Five years of synergistic scientific effort on phenylketonuria therapeutic development and molecular understanding. **Mol Genet Metab**, v.86, Suppl 1, 2005.

BLOMQUIST, H. K.; GUSTAVSON, K. H.; HOLMGREN, G. Severe mental retardation in five siblings due to maternal phenylketonuria. **Neuropediatrics**, v.11, n.3, p.256-261, 1980.

BRANDALIZE, S. R. C. **Avaliação de resultados do programa de prevenção e promoção da saúde de fenilcetonúricos no estado do Paraná**: condição motora dos portadores da fenilcetonúria com diagnóstico precoce. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade Estadual de Ponta Grossa-Pr, interinstitucional com a Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2002.

BRANDALIZE, S. R. C.; CZERESNIAB, D. Evaluation of the program for prevention and health promotion in phenylketonuria patients in Brazil. **Rev Saúde Pública**, v.38, n.2, 2004.

BRASIL. Lei n.º 8.069, de 13 de julho de 1990. Dispõe sobre o Estatuto da Criança e do Adolescente e dá outras providências. Disponível em: <www.presidencia.gov.br/CCivil/Leis/L8069.htm>. Acesso em: 10 abr. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Clínica e Diretrizes Terapêuticas. Portaria n.º 847, de 06 de novembro de 2002. Disponível em: <dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/PORT2002/PT-847.htm>. Acesso em: 2 set. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria SAS/MS n.º 712, de 17 de dezembro de 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2010/prt0712_17_12_2010.html>. Acesso em: 2 set. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. SUS - Programa de Triagem Neonatal. Portaria n.º 822/GM, de 06 de junho de 2001. Brasília, DF. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/port2204/Gm/GM-2695.htm>>. Acesso em: 10 abr. 2009.

BURGARD, P.; RUP, A.; KONECKI, D. S.; TREFZ, F. K.; SCHMIIDT, H.; LICHTER-KONECKI, U. Phenylalanine hydroxylase genotypes, predicted residual enzyme activity and phenotypic parameters of diagnosis and treatment of phenylketonuria. **Eur J Pediatr**, v.155, Suppl 1, p.S11-5, 1996.

CABALSKA, M. B.; NOWACZEWSKA, I.; SENDECKA, E.; ZORSKA, K. Longitudinal study on early diagnosis and treatment of phenylketonuria in Poland. **Eur J Pediatr**, v.155, Suppl 1, p.S53-55, 1996.

CAMARGO NETO, E.; SCHULTE, J.; ANELE, E. V.; RUBIM, R.; LEWIS, E.; DE MARI, J.; BRITES, A.; PIRES, R. F.; GIUGLIANI, R. Tirosinemia neonatal transitória: uma alteração freqüente. **J Pediatr** (Rio J), v.74, n.6, p.447-450, 1998.

CAPOBIANGO, M. **Extração das proteínas do fubá de milho e obtenção de hidrolisados proteicos com baixo teor de fenilalanina**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Alimento - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CARROL, A. E.; DOWNS, S. M. Comprehensive cost-utility analysis of newborn screening strategies. **Pediatrics**, v.117, 5Pt 2, p.S287-295, 2006.

CARVALHO, T. M. Resultados do levantamento epidemiológico da sociedade brasileira de triagem neonatal. **Rev Méd Minas Gerais**, v.13, 1 Supl 2, p.S109-S135, 2003.

CARVALHO, T. M.; VARGAS, P. R.; SANTOS, H. M. P. Dados preliminares. **Rev Méd Minas Gerais**, v.13, 1 Supl 2, p.S40-106, 2003.

CEARÁ. Secretaria da Saúde do Estado. Portaria n.º 535 de 20 de abril de 2006. Disponível em: < <http://www.saude.ce.gov.br/internet/publicacoes/protocolos/u07.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2009.

CECHAK, P.; ZIDLICKY, A. Determination of phenylalanine in serum by a modified fluorimetric method in the diagnosis of phenylketonuria. **Acta Univ Carol Med Monogr**, 79 Pt 3, p.53-55, 1977.

CEGLAREK, U.; MÜLLER, P.; STACH, B.; BÜHRDEL, P.; THIERY, J.; KIESS, W. Validation of the phenylalanine/tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry: sensitive newborn spectrometry for phenylketonuria. **Clin Chem Lab Med**, v.40, n.7, p.693-697, 2002.

CHACE, D. H.; ADAM, B. W.; SMITH, S. J.; ALEXANDER, J. R.; HILLMAN, S. L.; HANNON, W. H. Validation of accuracy-based amino acid reference materials in dried-blood spots by tandem mass spectrometry for newborn screening assays. **Clin Chem**, v.45, n.8, p.1269-1277, 1998.

CHACE, D. H.; KALAS, T. A. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. **Clin Biochem**, v.38, n.4, p.296-309, 2005.

CHACE, D. H.; KALAS, T. A.; NAYLOR, E. W. The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v.3, p.17-45, 2002.

CHACE, D. H.; MILLINGTON, D. S.; TERADA, N.; KAHLER, S. G.; ROE, C. R.; HOFMAN, L. F. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. **Clin Chem**, v.39, n.1, p.66-71, 1993.

CORNEJO, V. E.; RAIMANN, E. B. Errores innatos del metabolismo de los aminoácidos. In: COLOMBO, M. C.; CORNEJO, V.; RAIMANN, B. **Errores innatos en el metabolismo del niño**. Santiago do Chile: Universitaria, 1999. p.59-65.

de BAULNY, H. O.; ABADIE, V.; FEILLET, F.; de PARSCAU, L. Management of phenylketonuria and hyperphenilalaninemia. **J Nutr**, v.137, 6 Suppl 1, p.1561S - 1563S, 2007.

DEGANI, A. L. G.; KASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Quim Nova na Escola**, n.7, p.21-25, 1998.

DING, Z.; HARDING, C. O.; THÖNY, B. State-of-the-art 2003 on PKU gene therapy. **Mol Genet Metab**, v.81, n.1, p.3-8, 2003.

DOOLEY, K. C. Enzymatic method for phenylketonuria screening using phenylalanine dehydrogenase. **Clin Biochem**, v.25, n.4, p.271-275, 1992.

ECONOMOU-PETERSEN, E.; HENRIKSEN, K. F.; GULDEBERG, P.; GÜTTLER, F. Molecular basis for nonphenylketonuria hyperphenylalaninemia. **Genomics**, v.14, n.1, p.1-5, 1992.

EL HUSNY, A. S.; DERNANDES-CALDATO, M. C. Erros inatos do metabolismo: revisão da literatura. **Rev Para Med**, v.20, n.2, p.41-45, 2006.

ERLANDSEN, H.; PATCH, M. G.; GAMEZ, A.; STRAUB, M.; STEVENS, R. C. Structural studies on phenylalanine hydroxylase and implications toward understanding and treating phenylketonuria. **Pediatrics**, v.112, 6 Pt 2, p.1557-1565, 2003.

ERLANDSEN, H.; RAYMOND, C.; STEVENS, R. C. The structural basis of phenylketonuria. **Mol Genet Metab**, v.68, n.2, p.103-125, 1999.

ERLANDSEN, H.; STEVENS, R. C. A structural hypothesis for BH4 responsiveness in patients with mild forms of Hyperphenylalaninaemia and phenylketonuria. **J Inherit Metab Dis**, v.24, n.2, p.213-230, 2001.

FEARING, M. K.; LEVY, H. L. Expanded newborn screening using tandem mass spectrometry. **Adv Pediatr.**, v.50, p.81-111, 2003.

FEILLET, F. Phenylketonuria. **Presse Med**, v.35, 3 Pt 2, p.502-508, 2006.

FIEGE, B.; BLAU, N. Assesment of tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in phenylketonuria. **J Pediatr**, v.150, n.6, p.627-630, 2007.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A.; LOPES, A. H. A.; SENEFONTE, F. R. A.; SOUZA JÚNIOR, V. G.; BOTELHO, C. A.; DUARTE, G. Fenilcetonúria materna: relato de caso. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.26, n.10, p.813-817, 2004.

FUSETTI, F.; ERLANDSEN, H.; FLATMARK, T.; STEVENS, R. C. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. **J Biol Chem**, v.273, n.27, p.16962-16967, 1998.

GARG, U.; DASOUKI, M. Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry: clinical and laboratory aspects. **Clin Biochem**, v.39, n.4, p.315-332, 2006.

GERASIMOVA, N. S.; STEKLOVA, I. V.; TUUMINEN, T. Fluorometric method for phenylalanine microplate assay adapted for phenylketonuria screening. **Clin Chem.**, v.35, n.10, p.2112-2115, 1989.

GUTHRIE, R.; SUSI, A. A simple Phenylalanine method for detecting Phenylketonuria in large populations of newborn infants. **Pediatrics**, v.32, n.3, p.338-343, 1963.

GÜTTLER, F. Hyperphenylalaninemia: diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. **Acta Paediatr Scand Suppl**, v.280, p.1-80, 1980.

GÜTTLER, F.; AZEN, C.; GULDBERG, P.; ROMSTAD, A.; HANLEY, W. B.; LEVY, H. L.; MATALON, R.; ROUSE, B. M.; TREFZ, F.; DE LA CRUZ, F.; KOCH, R. Impact of the phenylalanine hydroxylase gene on maternal phenylketonuria outcome. **Pediatrics**, v.112, 6 Pt 2, p.1530-1533, 2003.

GÜTTLER, F.; GULDBERG, P. Mutations in the phenylalanine hydroxylase gene: genetic determinants for the phenotypic variability of hyperphenylalaninemia. **Acta Paediatr Suppl**, v.407, p.49-56, 1994.

HARDING, C. O. Progress toward cell-directed therapy for phenylketonuria. **Clin Genet**, v.74, n.2, p.97-104, 2008.

HENDRIKSZ, C. J.; WALTER, J. H. Update on phenylketonuria. **Curr Paediatrics**, v.14, p.400-406, 2004.

HOEKSMA, M.; REIJNGOUD, D. J.; PRUIM, J.; DE VALK, H. W.; PAANS, A. M.; VAN SPRONSEN, F. J. Phenylketonuria: High plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis. **Mol Genet Metab**, v.96, n.4, p.177-182, 2009.

HUNT, D. F.; GIORDANI, A. B.; RHODES, G.; HEROLD, D. A. Mixture analysis by triple quadrupole mass spectrometry: Metabolic profiling of urinary carboxylic acids. **Clin Chem**, v.28, n.12, p.2587-2592, 1982.

JÄGGI, L.; ZURFLÜH, M. R.; SCHULER, A.; PONZONE, A.; PORTA, F.; FIORI, L.; GIOVANNINI, M.; SANTER, R.; HOFFMANN, G. F.; IBEL, H.; WENDEL, U.; BALLHAUSEN, D.; BAUMGARTNER, M. R.; BLAU, N. Outcome and long-term follow-up of 36 patients with tetrahydrobiopterin deficiency. **Mol Genet Metab**, v.93, n.3, p.295-305, 2008.

JARDIM, L. B.; PALMA-DIAS, R.; SILVA, L. C. S.; ASTHON-PROLLA, P.; GIULIANI, R. Maternal hyperphenylalaninaemia as a cause of microcephaly and neonatal retardation. **Acta Paediatr**, v.85, n.8, p.943-946, 1996.

KANUFRE, V. C.; STARLING, A. L.; LEÃO, E.; AGUIAR, M. J.; SANTOS, J. S.; SOARES, R. D.; SILVEIRA, A. M. Breastfeeding in the treatment of children with phenylketonuria. **J Pediatr** (Rio J), v.83, n.5, p.447-452, 2007.

KNOX, J.; KAUER, H. **High performance liquid chromatography**. (P. R. Brown and R. A. Hartwick, eds.). New York: Wiley Intersc, 1989.

KOCH, R.; BURTON, B.; HOGANSON, G.; PETERSON, R.; RHEAD, W.; ROUSE, B.; SCOTT, R.; WOLFF, J.; STERN, A. M.; GÜTTLER, F.; NELSON, M.; DE LA CRUZ, F.; COLDWELL, J.; ERBE, R.; GERAGHTY, M. T.; SHEAR, C.; THOMAS, J.; AZEN, C. Phenylketonuria in adulthood: a collaborative study. **J Inherit Metab Dis**, v.25, n.5, p.333-346, 2002.

KOCH, R.; WENZ, E. Phenylketonuria. **Annu Rev Nutr**, v.7, p.117-135, 1987.

KONECKI, D. S.; WANG, Y.; TREFZ, F. K.; LICHTER-KONECKI, U.; WOO, S. L. Structural characterization of the 5' regions of the human phenylalanine hydroxylase gene. **Biochemistry**, v.31, n.35, p.8363-8368, 1992.

KOWALSKA, B. Effect of maternal phenylketonuria on the development of 2 children with phenylketonuria]. **Pol Tyg Lek**, v.41, n.14, p.448-450, 1986.

KRAUCH, G.; MÜLLER, E.; AMINOS, A.; BREMER, H. J. Comparison of the protein quality of dietetically treated phenylketonuria patients with the recommendation of the WHO Expert Consultation. **Eur J Pediatr**, v.155, Supl 1, p.S153-S157, 1996.

KWOK, S. C.; LEDLEY, F. D.; DiLELLA, A. G.; ROBSON, K. J.; WOO, S. L. Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. **Biochemistry**, v.24, n.3, p.556-561, 1985.

LARA, M. G. Preparação e escalonamento de um hidrolizado enzimático de proteínas do soro de leite bovino. **Rev Bras Cienc Farm**, v.41, p.459-466, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LEVY, H. L.; GULDBERG, P.; GÜTTLER, F.; HANLEY, W. B.; MATALON, R.; ROUSE, B. M.; TREFZ, F.; AZEN, C.; ALLRED, E. N.; DE LA CRUZ, F.; KOCH, R. Congenital heart disease in maternal phenylketonuria: report from the Maternal PKU Collaborative Study. **Pediatr Res**, v.49, n.5, p.636-642, 2001.

LEVY, H.; BURTON, B.; CEDERBAUM, S.; SCRIVER, C. Recommendations for evaluation of responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH4) in phenylketonuria and its use in treatment. **Mol Genet Metab**, v.92, n.4, p.287-291, 2007.

LIDKSY, A. S.; ROBSON, K. J.; THIRUMALACHARY, C.; BARKER, P. E.; RUDDLE, F. H.; WOO, S. L. The PKU locus in man is on chromosome 12. **Am J Hum Genet**, v.36, n.3, p.527-533, 1984.

LUKACS, Z.; SANTER, R. Evaluation of electrospray-tandem mass spectrometry for the detection of phenylketonuria and other rare disorders. **Mol Nutr Food Res**, v.50, n.4-5, p.443-450, 2006.

MARQUES, U. M. L. Fenilcetonúria: aspectos bioquímicos, nutricionais e importância da alimentação. **Cad Nutr**, v.11, p.51-68, 1996.

MARTINS, A. M. **Erros inatos do metabolismo**: abordagem clínica. 2.ed. São Paulo, 2003.

MARTON DA SILVA, M. B. G.; LACERDA, M. R. Teste do pezinho: porque coletar na alta hospitalar. **Rev Eletrônica Enf**, v.5, n.2, p.50-54, 2003.

MATALON, K. M. The developments in Phenylketonuria. **Topics Clin Nutr**, v.16, n.4, p.41-50, 2001.

MATALON, R.; MICHALS, K. Phenylketonuria: screening, treatment and maternal PKU. **Clin Biochem**, v.24, n.4, p.337-342, 1991.

MATALON, R.; SURENDRAN, S.; MATALON, K. M.; TYRING, S.; QUAST, M.; JINGA, W.; EZELL, E.; SZUCS, S. Future role of large neutral amino acids in transport of phenylalanine into the brain. **Pediatrics**, n.112, 6 Pt 2, p.1570-1574, 2003.

McCAMAN, M. W.; ROBINS, E. Fluorometric method for determination of phenylalanine in serum. **J Lab Clin Med**, v.59, p.886-890, 1963.

MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, U. M. L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. **Rev Saúde Pública**, v.34, n.1, p.86-96, 2000.

MITCHELL, J. J.; SCRIVER, C. R. Phenylalanine Hydroxylase Deficiency PAH Deficiency. Includes: Hyperphenylalaninemia (HPA), Phenylketonuria (PKU), Variant PKU, Washinton, Seattle. Disponível em: <www.genetests.org>. Acesso em: 29 mar. 2007.

MONTEIRO, L. T. B.; CÂNDIDO, L. M. B. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. **Rev Nutr**, v.19, n.3, p.381-387, 2005.

MULTANOWSKI, M. B.; PIETRZIK, J. J.; DIDYCZ, B.; SZYMCZAKIEWICZ-MULTANOWSKA, A. Development of a model for assesment of phenylalanine hydroxylase activity in newborns with phenylketonuria receiving tetrahydrobiopterin: a potencial practical implementation. **Mol Genet Metab**, v.94, n.3, p.389-390, 2008.

MUNTAU, A. C.; RÖSCHINGER, W.; HABICH, M.; DEMMELMAIR, H.; HOFFMANN, B.; SOMMERHOFF, C. P.; ROSCHER, A. A. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med*, v.347, n.26, p.2122-2132, 2002.

PERKINELMER LIFE AND ANALYTICAL SCIENCES, W.O. **NeoGram PKU tandem mass spectrometry kit**. Mustionkatu, Turku, Finlândia, 2005.

PERKINELMER LIFE AND ANALYTICAL SCIENCES, W.O. **NeoGram Amino acids and acylcarnitines non-derivatized tandem mass spectrometry kit**. Mustionkatu, Turku, Finlândia, 2007a.

PERKINELMER LIFE AND ANALYTICAL SCIENCES, W.O. **Neonatal Phenylalanine Kit NP-4000**. Mustionkatu, Turku, Finlândia, 2007b.

PHOMMARINH, M.; SCRIVER, C. Phenylalanine hidroxylase (PHA) mutation map. **OMIN**. Revised January 8, 2007. Disponível em: <www.pahdb.mcgill.ca>. Acesso em: 15 set. 2011.

RASHED, M. S.; RAHBEENI, Z.; OZAND, P. T. Application of eletrospray tandem mass spectrometry to neonatal screening. **Semin Perinatol**, v.25, n.2, p.183-195, 1999.

RINALDO, P.; TORTORELLI, S.; MATEM, D. Recent developments and new applications of tandem mass spectrometry in newborn screening. **Curr Opin Pediatr**, v.16, n.4, p.427-433, 2004.

RIVERO, A.; GRIJALBA, A.; PALACIOS, A.; MERLO, S. G. Comparison of two different methods for measurement of phenylalanine in dried blood spots. **Clin Chem Lab Med**, v.38, n.8, p.773-776, 2000.

ROUSE, B.; MATALON, R.; KOCH, R.; AZEN, C.; LEVY, H.; HANLEY, W.; TREFZ, F.; DE LA CRUZ, F. Maternal phenylketonuria syndrome: congenital heart defects, microcephaly, and developmental outcomes. **J Pediatr**, v.136, p.57-61, 2000.

SANTOS, L. L.; MAGALHÃES, M. de C.; JANUÁRIO, J. N.; AGUIAR, M. J.; CARVALHO, M. R. The time has come: a new scene for PKU treatment. **Genet Mol Res**, v.5, n.1, p.33-44, 2006.

SARKISSIAN, C. N.; GÀMEZ, A. Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria: where are we now? **Mol Genet Metab**, v.86, Suppl 1, p.22-26, 2005.

SAUDUBRAY, J. M.; CHARPENTIER, C. Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, L.; SLY, W. S.; VALLE, D. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995. p.327-400.

SCHMIDT, B. J.; MARTINS, A. M.; FISBERG, R. M.; MÜLLER, R.; ADELL, A. C. A.; SUBERO, E. M. Fenilcetonúria: aspectos clínicos e terapêuticos. **Pediatr Dia**, v.3, n.5, p.257-260, 1987.

SCHOEN, E. J.; BAKER, J. C.; COLBY, C. J.; TO, T. T. Cost-Benefit Analysis of Universal Tandem Mass Spectrometry for Newborn Screening. **Pediatrics**, v.110, n.4, p.781-784, 2002.

SCRIVER, C. R.; KAUFMAN, S. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine hydroxylase deficiency. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. R.; SLY, W.; VALLE, D. (Eds.). **The Metabolic e Molecular Bases of Inherited Disease**. 8.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p.1667-1708.

SILVA, V. D. M.; DE MARCO, L. M.; DELVIRO, F. M.; AGUIAR, M. J. B.; COELHO, J. V.; SILVESTRE, M. P. C. Emprego da pancreatina imobilizada no preparo de hidrolizados de soro de leite com teor reduzido de fenilalanina. **Alim Nutr Araraquara**, v.16, n.1, p.21-31, 2005.

SOUZA, I. C. N. **Triagem urinária para erros inatos de metabolismo em crianças com atraso no desenvolvimento**. Dissertação (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2002.

SURTESS, R.; BLAU, N. The neurochemistry of phenylketonuria. **Eur J Pediatr**, v.159, Supl 2, p.S109-S113, 2000.

THERRELL, B. L.; ADAMS, J. Newborn screening in North America. **J Inherit Metab Dis**, v.30, n.4, p.447-465, 2007.

THOMPSON, G. N.; HALLIDAY, D. Significant phenylalanine hidroxilation in vivo in patients wiyh classical phenylketonuria. **J Clin Invest**, v.86, n.1, p.317-322, 1990.

THÖNY, B.; AUERBACH, G.; BLAU, N. Tetrahydrobiopterin: biosynthesis, regeneration, and functions. **J Biochem**, v.347, Pt 1, p.1-16, 2000.

THÖNY, B.; DING, Z.; MARTINES, A. Tetrahyfrobiopterin protects activity in vivo: implications for tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia. **FEBS Lett**, v.577, n.3, p.507-511, 2004.

TOURYAN, A. Y.; SIDBURY, J. B. Phenylketonuria and hiperphenylalaninemia. In: STANBURY, I. B.; WINGAARDEN, J. B.; FIDRICHSON, D. S. **The Metabolic Basis of Inherited Disease**. New York: McGaw Hill, 1978.

TUOTO, E. A. **História da medicina**. Disponível em: <Historyofmedicine.blogspot.com>. Acesso em: 22 jun. 2009.

VILARINHO, L.; QUEIRÓS, A.; LEANDRO, P.; ALMEIDA, I. T.; RIVERA, I. Fenilcetonúria revisitada. **Arq Med**, v.20, n.5-6, p.161-172, 2006.

WEGLAGE, J.; ULLRICH, K.; PIETSCH, M.; FÜNDERS, B.; GÜTTLER, F.; HARMS, E. Intellectual, neurologic, and neuropsychologic outcome in untreated subjects with nonphenylketonuria and hyperphenylalaninemia. German Collaborative Study on Phenylketonuria. **Pediatr Res**, v.42, n.3, p.378-384, 1997.

WILCKEN, B.; WILEY, V.; HAMMOND, J.; CARPENTER, K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by Tandem Mass Spectrometry. **N England J Med**, n.23, p.2304-2312, 2003.

WILLARD, H. H.; MERRIT JR., L. L.; DEAN, J. A.; SETTLE JR., F. A. **Métodos Instrumentales de Análisis**. México: Iberoamerica, 1991. Disponível em: <www.Ub.es/biocel/wbc/técnicas/mfluorescencia.htm>. Acesso em: 15 ago. 2009.

WILLIAMS, R. A.; MAMOTTE, C. D.; BURNETT, J. R. Pnenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. **Clin Biochem Rev**, v.29, n.1, p.31-41, 2008.

WITTIG, E. O.; DOMINGOS, M. T. **História da triagem neonatal**. 2007. Disponível em: <unisert.org.br/historia.htm>. Acesso em: 22 jun. 2009.

ZHAOBING, D. H.; HARDING, C. O.; THÖNY, B. State-of-the-art 2003 on PKU gene therapy. **Mol Genet Metab**, v.81, n.1, p.3-8, 2004.

WOO, S. L.; LIDSKY, A. S.; GÜTTLER, F.; CHANDRA, T.; ROBSON, K. J. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classifical phenylketonuria. **Nature**, v.306, p.151-155, 1983.

Sites consultados:

www.isns-neoscreening.org

www.icb.ufmg.br/.../grupos/grupo4/principal.html

www.pt.wikipedia.org/wiki/fenilalanina_hidroxilase

<http://www.ghr.nlm.nih.gov/gene=pah>

laguna.fmedic.unam.mx/~evasquez/0403/enfermed

<http://nutbiobio2010.blogspot.com/>

es.wikipedia.org/wiki/fenilcetonuria

pkubiobio.blogspot.com

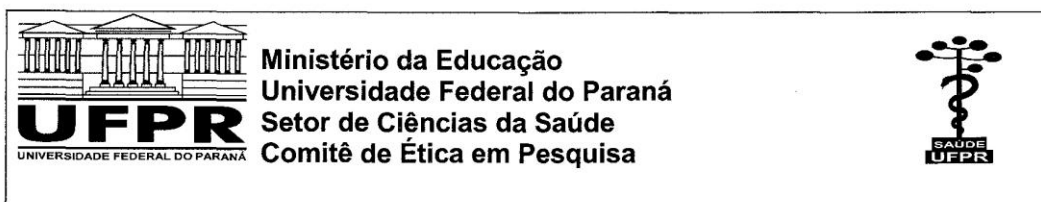
www.ufv.br/dbg/bio240/dg14.htm

www.vaclan-ieo.es/proyecto04.html

commons.wikimedia.org/wiki/File:MS_MS.png

ANEXOS

ANEXO 1
CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA EM SERES HUMANOS



Curitiba, 06 de agosto de 2008.

Ilmo (a) Sr. (a)
Regina Maria Tokunaga

Nesta

Prezado (a) Pesquisador (a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **“Concentração de fenilalanina em recém-nascidos e em crianças com hiperfenilalaninemias no Estado do Paraná, detectada por fluorimetria e por espectrometria de massas.”**, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 06 de agosto de 2008.

Registro CEP/SD: 568.105.08.07

CAAE:2409.0.000.091-08

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 06/02/2009.

Atenciosamente

Profa. Dra. Liliana Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Profª. Dra. Liliana Maria Labronici
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa - SD/UFPR

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-Pr. – CEP: 80060-240
Fone/fax: 41-360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 2

PORTARIA N.º 712, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2010

Diário Oficial

Imprensa Nacional

REPÚBLICA FEDERATIVA DO
BRASIL
BRASÍLIA - DF

Nº 244 – 22/12/10 – Seção 1 - p.107

MINISTÉRIO DA SAÚDE

SECRETARIA DE ATENÇÃO A SAÚDE

PORTARIA Nº 712, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2010

O Secretário de Atenção à Saúde, no uso de suas atribuições, Considerando a necessidade de se atualizar parâmetros sobre a fenilcetonúria no Brasil e de diretrizes nacionais para diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos indivíduos com esta doença;
Considerando que os Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) são resultado de consenso técnico-científico e são formulados dentro de rigorosos parâmetros de qualidade, precisão de indicação e posologia;
Considerando as sugestões dadas à Consulta Pública SAS/MS nº 41, de 10 de novembro de 2010;
Considerando a Portaria SAS/MS nº 375, de 10 de novembro de 2009, que aprova o roteiro a ser utilizado na elaboração de PCDT, no âmbito da Secretaria de Atenção à Saúde - SAS; e
Considerando a avaliação da Secretaria de Atenção à Saúde - Departamento de Atenção Especializada, resolve:

Art. 1º - Aprovar, na forma do Anexo desta Portaria, o PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS – FENILCETONÚRIA.

§ 1º - O Protocolo objeto deste Artigo, que contém o conceito geral da fenilcetonúria, critérios de diagnóstico, critérios de inclusão e de exclusão, tratamento e mecanismos de regulação, controle e avaliação, é de caráter nacional e deve ser utilizado pelas Secretarias de Saúde dos Estados e dos Municípios na regulação do acesso assistencial, autorização, registro e ressarcimento dos procedimentos correspondentes.

§ 2º - É obrigatória a observância desse Protocolo para fins de dispensação de insumo nele previsto.

§ 3º - Os gestores estaduais e municipais do SUS, conforme a sua competência e pactuações, deverão estruturar a rede assistencial, definir os serviços referenciais e estabelecer os fluxos para o atendimento dos indivíduos com a doença em todas as etapas descritas no Anexo desta Portaria.

Art. 2º - Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 3º - Fica revogada a Portaria SAS/MS nº 847, de 31 de outubro de 2002, publicada no Diário Oficial da União Nº 213, de 4 de novembro de 2002, Seção 1, p. 83.

ALBERTO BELTRAME

ANEXO

PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS FENILCETONÚRIA

1 Metodologia de busca da literatura

Foram realizadas buscas nas bases de dados Medline/Pubmed, Embase e Cochrane.

Na base de dados Medline/Pubmed, a busca foi realizada em 26/05/2010 com os unitermos "Phenylketonurias" [Mesh] AND "Therapeutics"[Mesh], restringindo-se a artigos em humanos e a tipos ensaio clínico, ensaio clínico randomizado, metanálise, revisão e consenso, o que resultou em 108 artigos.

Na base de dados Embase, a busca foi realizada em 05/07/2010 com os unitermos 'Phenylketonuria'/exp AND 'Therapy'/ex, restringindo-se a artigos em humanos e a tipos ensaio clínico controlado, metanálise e revisão sistemática, o que resultou em 60 artigos.

Na Cochrane, foi realizada busca em 27/07/2010. Foram identificadas 14 revisões sistemáticas com o termo "Phenylketonuria".

Destas, apenas 2 abordavam a doença e foram incluídas neste protocolo.

As demais eram sobre outras doenças não relacionadas.

Foram também consultados livros-texto de Genética, Endocrinologia Pediátrica e erros inatos do metabolismo, além do Up-ToDate, versão 18.1, disponível em www.uptodateonline.com. Outros artigos não indexados também foram incluídos na elaboração deste protocolo.

2. INTRODUÇÃO

Fenilcetonúria (FNC) é uma doença genética, autossômica recessiva, causada por mutações no gene localizado no cromossomo 12q22-q24, o qual codifica a enzima hepática fenilalanina-hidroxilase (FAH). A ausência ou deficiência desta enzima impede a conversão hepática de fenilalanina (FAL), um dos aminoácidos essenciais e mais comuns do organismo, em tirosina, causando acúmulo de FAL no sangue e em outros tecidos(1-7).

É uma doença metabólica rara, com prevalência global média estimada de 1:10.000 recém-nascidos8. A incidência varia entre as diferentes nações do mundo e os diferentes grupos étnicos. As maiores taxas são

encontradas na Irlanda (1:4.500) e na Turquia (1:2.600), e as menores, na Finlândia, no Japão e na Tailândia (1:200.000, 1:143.000 e 1:212.000, respectivamente)^{9,10}.

Em 2001, Carvalho¹¹, em levantamento feito no Brasil por meio do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), encontrou uma prevalência de FNC de 1:15.839. Em 2002, a prevalência foi de 1:24.780. Este levantamento referia-se a 18 estados brasileiros (12).

Desde a descoberta deste transtorno metabólico, houve enorme progresso em relação a seu diagnóstico precoce, tratamento e seguimento^(13,14).

Mais de 500 mutações foram identificadas no gene responsável pela doença, o que corresponde a uma gama enorme de fenótipos e, portanto, a uma grande variedade de manifestações clínicas e diversidade de gravidade. Níveis variados e crescentes de FAL podem ocorrer. O excesso é neurotóxico e leva a defeitos no desenvolvimento neuromotor e neurocognitivo (1-7). O retardo mental é irreversível se não diagnosticado e tratado em idade precoce (7).

FNC é o mais frequente erro inato do metabolismo dos aminoácidos (15). O alto nível sanguíneo leva à excreção urinária aumentada de FAL e de seus metabólitos, as fenilcetonas⁽¹⁶⁾ fenilacetato e fenilactato⁽¹⁾.

Aproximadamente 75% do catabolismo da FAL da dieta é realizado via FAH, que catalisa sua conversão em tirosina. Na FNC, os níveis de FAL estão aumentados enquanto os de tirosina são praticamente normais ou baixos. O cofator enzimático tetra-hidrobiopterina (BH4) é necessário para a atividade da FAH e defeitos no seu metabolismo são responsáveis por aproximadamente 2% dos casos de hiperfenilalaninemia (HFA), definida pelo valor sanguíneo de FAL acima de 2 mg/dl (1,4).

Os indivíduos com deficiência de FAH apresentam níveis plasmáticos de FAL persistentemente acima de 2 mg/dl (120 micromol/l) sem tratamento (9).

Existem algumas classificações para as HFAs, que se baseiam nas concentrações plasmáticas da FAL ao diagnóstico (paciente ainda sem tratamento), na tolerância à FAL e no grau de deficiência da FAH^{1,7,10,16-18}. Entretanto, apenas os graus de HFA mais elevados são prejudiciais para o desenvolvimento cognitivo¹⁹.

Muitas vezes, níveis abaixo de 10 mg/dl podem significar HFA transitória, por imaturidade hepática ou enzimática. Nas formas transitórias, os pacientes não necessitam de dieta isenta de FAL porque os níveis tendem a diminuir nos primeiros meses de vida, nunca se elevam acima de 10 mg/dl e os pacientes têm desenvolvimento psicomotor normal (2).

O mecanismo fisiológico responsável pelo retardo mental na HFA não está ainda bem entendido, mas a FAL por si só parece ser o agente tóxico maior (3,16). O excesso de FAL interferiria no crescimento cerebral, no processo de mielinização, na síntese dos neurotransmissores e no desenvolvimento sináptico e dendrítico (1,3). O excesso de FAL inibe competitivamente o transporte e a captação neuronal de outros aminoácidos cerebrais através da barreira hematoencefálica, causando diminuição da concentração cerebral intracelular de tirosina e de 5-hidroxitriptofano, limitando a produção de serotonina e das catecolaminas dopamina, noradrenalina e adrenalina, além da melatonina (3).

A variabilidade entre os fenilcetonúricos não depende apenas dos fatores genéticos; fatores ambientais e estilos de vida diferentes, como a idade do início do tratamento e o grau de controle da dieta, também contribuem para estas variações (16).

Os recém-nascidos portadores de HFA são assintomáticos antes de passarem a receber alimentos que contenham FAL (leite materno ou fórmulas infantis próprias da idade). Se a doença não for detectada pelo rastreamento metabólico, seu início é insidioso e só se manifestará clinicamente em torno do 3o ou 4o mês de vida^{1,20}.

Nessa época, a criança começa a apresentar atraso global do desenvolvimento neuropsicomotor, podendo mostrar irritabilidade ou apatia, perda de interesse pelo que a rodeia, convulsões, eczema crônico, hipopigmentação cutânea, cheiro característico da urina, da pele e dos cabelos (odor de rato pela presença do ácido fenilacético) e padrão errático do sono (1,3,12,20).

A principal característica da doença não tratada é retardo mental, que vai piorando durante a fase de desenvolvimento do cérebro e que se estabilizaria com a maturação completa deste órgão. O quociente de inteligência (QI) mede a extensão deste retardo e varia de leve a gravemente prejudicado¹. A HFA não tratada resulta em progressivo retardo mental, com QI abaixo de 50. A piora está relacionada aos níveis sanguíneos de FAL (6).

Com o passar do tempo, a criança pode apresentar problemas de postura para sentar, anormalidade da marcha, hiperatividade e distúrbios comportamentais¹. A fala e o desenvolvimento intelectual vão se tornando bastante afetados³. Pode haver também comprometimento emocional, como depressão, e complicações neurológicas, como tremores, espasticidade, ataxia e epilepsia que iniciam na infância e progridem na adolescência⁶.

Se a doença for diagnosticada logo após o nascimento e o paciente for mantido em dieta restrita em FAL, os sintomas podem ser prevenidos e a criança pode ter desenvolvimento e expectativa de vidas normais (3,7). O acompanhamento de meninas com FNC ou com HFA não FNC⁹ merece atenção especial em caso de gravidez. A dieta isenta de FAL deve ser orientada antes e durante toda a gestação com o objetivo de evitar a embriopatia por FAL ou síndrome da FNC materna, visto que pode ocasionar malformações cardíacas, microcefalia, anomalias vertebrais, estrabismo e retardo mental mesmo que o feto não tenha FNC (1,2).

3. CLASSIFICAÇÃO ESTATÍSTICA INTERNACIONAL DE DOENÇAS E PROBLEMAS RELACIONADOS À SAÚDE (CID-10)

E 70.0 Fenilcetonúria clássica

E 70.1 Outras hiperfenilalaninemias (por deficiência de fenilalanina-hidroxilase)

4. DIAGNÓSTICO

4.1. CLÍNICO

Níveis elevados de FAL causam dano neurológico às crianças em desenvolvimento, resultando em retardo mental, microcefalia, retardo da fala, convulsões, distúrbios do comportamento, irritabilidade, hipopigmentação cutânea, eczemas e odor de rato na urina (2,21). É imperativo acompanhar o desenvolvimento cognitivo e social das crianças e dos adultos afetados². Mesmo com o controle dietético precoce, ocorrem déficits de processamento da informação, de execução e de abstração em qualquer idade (15).

4.2. LABORATORIAL

Rastreamento neonatal é o modo mais eficaz de diagnosticar FNC. A coleta de sangue deve ser feita a partir de 48 horas até o 5º dia do nascimento após exposição a dieta protéica. Recém-nascidos com níveis elevados devem ser encaminhados para avaliação diagnóstica, conforme recomenda o Programa Nacional de Triagem Neonatal do Ministério da Saúde (16). O teste se tornou rotina devido ao excelente prognóstico para crianças com deficiência de FAH tratadas precocemente pelo alto risco de dano cerebral grave e irreversível para as que não eram tratadas⁽⁹⁾.

Os métodos laboratoriais utilizados para medir FAL são espectrometria de massa em tandem, cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), cromatografia gasosa e testes enzimáticos e fluorimétricos¹.

Resultado positivo de rastreamento para HFA ocorre quando os níveis de FAL estão acima do ponto de corte, ou seja, acima de 2 mg/dl (120 micromol/l) e devem ser confirmados por uma segunda análise dos aminoácidos FAL e tirosina (quantitativa). Nos casos confirmados, geralmente a razão FAL/tirosina é ≥ 3 . Nos pacientes com FNC, a tirosina está diminuída, e a análise da urina mostra excreção aumentada de fenilpiruvato, fenilactato e fenilacetato (3).

O diagnóstico de FNC é feito quando os níveis séricos de FAL encontram-se persistentemente elevados e os níveis de tirosina estão normais ou diminuídos, tendo sido excluída a deficiência de BH 4 (3,16,22). Excluir a deficiência de BH4 é importante para o processo diagnóstico (16). A BH4 é um cofator essencial para as enzimas fenilalanina-hidroxilase, tirosina-hidroxilase e triptofano-hidroxilase.

Defeitos no seu metabolismo seriam responsáveis por 2% dos pacientes com HFA. Clinicamente há aumento dos níveis de FAL séricos ou progressiva piora neurológica por diminuição da produção dos neurotransmissores dopamina, epinefrina, norepinefrina e serotonina.

O diagnóstico é feito pela dosagem de biopterina ou neopterina no sangue, na urina ou no Líquor (1).

Inexiste consenso internacional quanto ao ponto de corte para o tratamento, variando entre 6,7 mg/dl (400 micromol/l) no Reino Unido, 10 mg/dl (600 micromol/l) na Alemanha e França e 6 a 10 mg/dl (360 a 600 micromol/l) nos EUA (3).

Crianças com níveis acima de 10 mg/dl (600 micromol/l) devem começar com dieta logo que possível, idealmente com 7 a 10 dias de vida (16,22). Níveis entre 8 e 10 mg/dl (480-600 micromol/l) persistentes (pelo menos em 3 dosagens consecutivas, semanais, em dieta normal) também indicam tratamento¹⁶.

A análise molecular que avalia as mutações da FAH não é obrigatória para o diagnóstico, podendo auxiliar na detecção de heterozigotos, diagnóstico pré-natal, aconselhamento genético, acompanhamento e prognóstico da gravidade clínica a longo prazo (1,7,16).

5. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Serão incluídos neste protocolo de tratamento os pacientes com níveis de FAL igual ou maior do que 10 mg/dl (600 micromol/l) em dieta normal^{1,16} e todos os que apresentarem níveis de FAL entre 8 e 10 mg/dl persistentes (pelo menos em 3 dosagens consecutivas, semanais, em dieta normal) (10).

O rastreamento no Brasil é realizado pelo "teste do pezinho", cuja obrigatoriedade consta no inciso III do artigo 10 da Lei no 8.069, de 13/07/1990 (Estatuto da Criança e do Adolescente), e na Portaria GM/MS no 22, de 15/01/1992, que estabeleceu o Programa Nacional de Triagem Neonatal para diagnóstico precoce de fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito.

6. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Serão excluídos deste protocolo de tratamento os pacientes que apresentarem as seguintes condições:

aumento de FAL secundário a tirosinemia (caracterizado pelo aumento concomitante de FAL e tirosina);

hiperfenilalaninemia transitória (caracterizada pela normalização espontânea dos níveis de FAL durante os 6 primeiros meses de vida);

hiperfenilalaninemia por defeito de BH4 (os defeitos no metabolismo do BH4 são responsáveis por 2% dos casos com níveis aumentados de FAL. O diagnóstico diferencial é realizado pela dosagem de biopterina ou neopterina no sangue, na urina ou no Líquor)¹.

7. CASOS ESPECIAIS

GESTÇÃO

Meninas portadoras de FNC e de HFA não FNC⁹ em idade fértil deve receber orientação especial quanto aos métodos anticoncepcionais e ao planejamento da gravidez. A dieta isenta de FAL deve ser estabelecida antes e durante toda a gestação com o objetivo de evitar embriopatia por FAL ou síndrome da FNC materna (1,2,12,23).

A exposição intraútero ao excesso de FAL, potente agente teratogênico⁹, no início da vida fetal gera efeitos graves. A concentração de FAL é maior no feto do que no plasma materno (1), pois a placenta naturalmente concentra altos níveis de aminoácidos, entre eles FAL. Retardo mental ocorrerá em 90% destas crianças e malformações congênitas em 25%, dentre as quais malformações cardíacas, microcefalia, anomalias vertebrais e estrabismo (1,2). O período crítico para o sistema nervoso central, crânio e coração ocorre entre a 5ª e a 8ª semana após a última menstruação. Portanto, se uma grávida com FNC não estiver metabolicamente controlada

antes da 5ª semana de gestação, os níveis altos de FAL passam para o feto através da placenta e vão exercer efeitos teratogênicos irreversíveis no seu desenvolvimento (2).

O controle metabólico é atingido com níveis de FAL abaixo de 6 mg/dl antes da concepção e durante toda a gestação². As normas britânicas e alemãs recomendam manter estes níveis entre 1 e 4 mg/dl (60-240 micromol/l) antes e durante a gestação, enquanto o Estudo Colaborativo Materno de FNC, baseado em mais de 500 gestações, recomenda mantê-los entre 2-6 mg/dl (120-360 micromol/l) (16).

8. CENTRO DE REFERÊNCIA

O tratamento dos pacientes com FNC, conforme definido pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal do Ministério da Saúde, deve ser realizado em centros de atendimento estaduais especializados, incluindo, também, aconselhamento genético (9). O acompanhamento dos pacientes deve ser feito por equipe multidisciplinar com composição mínima de médico e nutricionista especializados, podendo agregar outros profissionais na dependência da estrutura do serviço (22).

9. TRATAMENTO

Dieta restrita em FAL é eficaz em reduzir os níveis sanguíneos de FAL e melhorar o QI e o prognóstico neuropsicológico dos pacientes com HFA (24).

O tratamento deve ser iniciado tão cedo quanto possível, idealmente até o 10º dia de vida. O aleitamento materno deve ser encorajado e associado ao uso de fórmula isenta de FAL. Os níveis de FAL devem ser diminuídos rapidamente (1,3,5,16,24).

Estudos randomizados controlados são necessários, mas a tendência atual é recomendar tratamento dietético para toda a vida (1,6,12,16,20,24-26). O conceito de que, devido à maturidade cerebral, o QI estabilizaria após os 10 anos de idade (27) não foi confirmado em recente metanálise que mostrou associação inversa entre os níveis de FAL e QI. Nesta metanálise, para cada aumento de 1,7 mg/dl nos níveis sanguíneos de FAL, houve redução de 1,3 a 3,9 pontos no QI em pacientes com FNC tratados precocemente, com níveis de FAL acima 6,5 a 12,5 mg/dl, mostrando que o cérebro continua susceptível à neurotoxicidade da FAL (10).

O suporte principal para o controle metabólico dos pacientes é dieta restrita em alimentos que contenham FAL combinada com um substituto proteico isento ou com taxas muito baixas de FAL. Geralmente são misturas de aminoácidos ou hidrolisados de proteínas que suprem as necessidades para crescimento e desenvolvimento normais (1,5,8,28,29), evitando níveis neurotóxicos de FAL, mas ao mesmo tempo oferecendo-o em quantidades mínimas necessárias. Estas quantidades podem vir das fórmulas industrializadas ou do próprio leite materno, que possui menor teor de FAL do que as fórmulas e maiores benefícios imunológicos e psicológicos (2,13,22,28,30,31).

As fórmulas são medicamentos que devem conter as quantidades recomendadas de vitaminas e sais minerais adequadas à faixa etária do paciente, ou seja, devem seguir as recomendações da Resolução RDC no 269, de 22/11/2005, da ANVISA, para pessoas normais. A fórmula isenta de fenilalanina é recomendada para todos os pacientes em todas as idades, sendo que a quantidade e qualidade (tipo de fórmula) varia conforme a idade e peso.

O tratamento é sempre acompanhado de monitoramento rigoroso dos níveis séricos da FAL

(1,16,22,28,30,32,33). O tratamento dietético restritivo é bem sucedido, requerendo adesão contínua dos pacientes e de suas famílias (22-24). Os maiores benefícios do manejo dietético ocorrem no recém-nascido e na criança, mas, conforme comentado anteriormente, o controle por toda a vida dos níveis da FAL sérica é recomendado para prevenir manifestações neurológicas, comportamentais e cutâneas na vida adulta (22, 34,35). Para crianças com FNC, visando não incorrer em prejuízo do seu crescimento, recomenda-se ingestão de proteínas acima (em torno de 113% a 129%) do preconizado para crianças não fenilcetonúricas da mesma faixa etária (36). A ingestão de fórmula deve ser dividida em 3 porções junto às refeições principais (37).

Quanto à população de adultos nascidos antes dos testes de rastreamento, portadores de incapacidades intelectuais, problemas de comportamento e dependentes, há estudo que sugere que a dieta restrita em FAL melhora o comportamento, o que, consequentemente, propicia melhor qualidade de vida aos pacientes e a seus cuidadores³⁸.

Outros estudos sugerem que diagnosticar adultos com retardo mental portadores de FNC é importante, já que o tratamento dietético específico é benéfico mesmo numa fase tardia (13,39). Os efeitos deletérios do excesso de FAL sobre o sistema nervoso central ocorridos nos primeiros anos de vida são irreversíveis, no entanto certos efeitos tóxicos sobre distúrbios comportamentais parecem ser reversíveis, como a melhora da agitação e da agressividade (40).

A composição da dieta para FNC mudou muito pouco desde que foi instituída nos anos 1950. Basicamente, é uma dieta pobre em proteínas suplementada por uma mistura de aminoácidos isenta de FAL e acrescida de minerais, vitaminas e outros nutrientes (21).

Segue um Guia Dietético para fnc.

Alimentos (1)

GRUPO VERDE
Permitidos -Alimentos deste grupo não precisam de cálculo do conteúdo de FAL para serem consumidos
Frutas: maioria das frutas, com exceção de figos secos
Vegetais: maioria dos vegetais, pickles em

vinagre
Gorduras: manteiga, margarina, toucinho, óleos e gorduras vegetais
Bebidas: limonada, café, chá, água mineral, sucos de frutas e refrigerante sem aspartame Açúcares: refinados, balas de frutas e gomas, mel, pirulitos, geleias de frutas, manjar, tapioca, sagu
GRUPO AMARELO
Alimentos deste grupo contêm níveis médios de FAL, devendo seu conteúdo ser calculado acuradamente. Pesem a comida após cozinhá-la
Vegetais: batatas, alho-poró, batata-doce
Frutas: banana (uma pequena porção por dia), abacate, maracujá, frutas secas
Alimentos especiais com baixo teor de proteína Arroz
GRUPO VERMELHO
Alimentos deste grupo contêm altos níveis de FAL e não devem ser consumidos por pacientes com FNC
Todos os tipos de carne, peixe, ovos
Nozes, soja, lentilha, ervilha, feijão, leite e produtos feitos destes alimentos
Laticínios: leite, queijos, sorvete, cremes
Grãos, mingau de leite, cereais, pão, massas, aveia
Chocolate e achocolatados

MacDonald e colaboradores⁴¹ demonstraram que o uso livre de frutas e vegetais contendo 51 a 100 mg/100 g de FAL não descompensa crianças portadoras de FNC e aumenta a tolerabilidade da dieta. São permitidos livremente bananas, cogumelos, alho-poró, abacate e passas de uvas secas.

COMPLEMENTOS

Os aminoácidos essenciais, as vitaminas e os sais minerais são administrados por meio de fórmulas alimentares, normalmente apresentadas em forma de pó e consumidas após dissolução em líquidos.

São misturas de aminoácidos sintéticos isentas de FAL e acrescidas dos elementos acima citados mais gorduras e carboidratos para suprir as necessidades das diferentes faixas etárias. Estas misturas possuem odor e paladar desagradáveis, e sua ingestão, contrariando as orientações, geralmente é feita de uma vez só, prejudicando sua utilização biológica e aumentando os efeitos adversos (náuseas, vômitos, tonturas, diarreia). A qualidade de vida sob esta dieta fica comprometida, e a adesão ao tratamento diminui à medida que o paciente cresce (20,21). No mercado estão disponíveis várias formulações que se diferenciam pelo teor calórico, pela adição de gordura e carboidratos e, principalmente, pela especificação etária. Embora sejam de fácil prescrição, são produtos caros e resultam numa dieta pouco palatável e monótona (20). Um primeiro estudo randomizado controlado cruzado foi realizado com um substituto proteico líquido pronto para ser ingerido. Sua resposta foi eficaz, melhorando a adesão e a independência de adolescentes e adultos (42).

Alguns substitutos proteicos em cápsulas, pequenas barras e sachês com gosto e cheiro de frutas mais palatáveis já são oferecidos em lojas especializadas, com melhor aceitação do que as fórmulas tradicionais (43). No entanto, a restrição dietética, que é o grande problema da adesão, continua.

9.1. ESQUEMAS DE ADMINISTRAÇÃO

As quantidades de aminoácidos, proteínas e FAL recomendadas estão detalhadas nas tabelas abaixo.

Para crianças de até 2 anos de idade, recomenda-se que o consumo da fórmula isenta de FAL seja distribuído igualmente ao longo das 24 horas do dia para minimizar as flutuações nas concentrações plasmáticas de FAL e dos aminoácidos. A administração deve ser feita em 6 porções iguais, divididas durante o dia e a noite, reproduzindo o padrão fisiológico dos indivíduos normais (44).

Para adolescentes e adultos, as orientações variam e são mais ou menos liberais, mas o consenso é que a dieta deve ser seguida por toda a vida (9).

TABELA 1 - Recomendações Diárias de Ingestão de Aminoácidos e Proteína Totais para Lactentes, Crianças e Adultos Portadores de FNC

Idade (anos)	Proteína da fórmula metabólica (g/kg de peso/dia)	Proteína total (g/kg de peso/dia)
--------------	---	-----------------------------------

0 a 2	2,5 (mínimo)	3
3 a 10	1,7	2 a 2,5
11 a 14	1,25	1,5
Acima de 14	0,8	1

Adaptado de MacDonald e colaboradores 200631; Acosta e colaboradores 200336; Cockburn e colaboradores 199345

TABELA 2 - Orientação Inicial para o Uso de FAL

Idade (anos)	Necessidade aproximada de FAL (mg/kg de peso/dia)
0 a 0,5	20 - 70
0,5 a 1	15 - 50
1 a 4	15 - 40
4 a 7	15 - 35
7 a 15	15 - 30
15 a 19	10 - 30

Fonte: Acosta e colaboradores 200336

9.2. TEMPO DE TRATAMENTO

O tratamento dietético restritivo em alimentos que contenham FAL deve ser mantido por toda a vida (1,2,6,12,16,22,25,26).

Desta maneira, a adesão à dieta é um dos fatores mais críticos a serem abordados pelas equipes multidisciplinares e gestores de saúde pública que lidam com esta doença²².

9.3. BENEFÍCIOS ESPERADOS

FNC é uma das poucas doenças genéticas em que o retardo mental pode ser prevenido com diagnóstico e tratamento precoces (21). Com o aumento da experiência e dos dados da literatura especializada, é consenso que a maior adesão ao tratamento e a manutenção da dieta por toda a vida promovem melhor resultado a longo prazo no que diz respeito ao crescimento, desenvolvimento, comportamento e cognição dos portadores de fenilcetonúria (22,31). São pessoas que passam a conviver em sociedade sem desvios comportamentais, vislumbrando o pleno exercício de sua cidadania, como indivíduos inclusos e produtivos (22,46).

10. MONITORIZAÇÃO

Recomenda-se que a monitorização dos níveis séricos de FAL seja feita a cada 15 dias nos pacientes fenilcetonúricos de até 1 ano de idade e nas mulheres grávidas e mensalmente nos demais ao longo da vida. Esta recomendação poderá ser adaptada às necessidades dos pacientes e às condições do centro de tratamento.

As concentrações de FAL recomendadas e associadas a um ótimo neuro-desenvolvimento são incertas. Não há consenso entre os diferentes centros americanos ou países. O Consenso do Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH) de outubro de 2000 recomenda⁴⁷: 0 a 12 anos - manter entre 2 a 6 mg/dl ou 120 a 360 micromol/l;

Mais de 12 anos - manter entre 2 e 15 mg/dl ou 120 a 900 micromol/l.

Níveis mais baixos - entre 2 a 10 mg/dl ou 120 a 600 micromol/l - são fortemente encorajados, já que o desenvolvimento cerebral continua durante a adolescência e pouco se sabe sobre níveis mais altos de FAL após os 12 anos de idade. Os guias enfatizam os fatores individuais na tomada de decisões em cada caso (8,16). Neste protocolo, a recomendação para os níveis-alvo de FAL estão contidos na Tabela 348.

Tabela 3 - Níveis-Alvo de FAL Preconizados

Idade	FAL alvo (micromol/l)	FAL alvo (mg/dl)
0 - 12 meses	120 - 360	2 - 6
1 - 13 anos	120 - 360	2 - 6
Acima de 13 anos	120 - 900	
- permitido-desejável-gestação	120 - 600 120 - 360	2 - 15 2 - 10 2-6

Fonte: Blau e Blaskovics (1996)⁴⁸

Estudos indicam alta incidência de osteopenia nestes pacientes, assim como deficiências nutricionais naqueles que não aderem à dieta ou que não consomem adequadamente a fórmula metabólica.

A deficiência de vitamina B12 é comum. Portanto, o controle de vitamina B12, ferritina, hemoglobina e cálcio deve ser realizado uma vez ao ano, e os pacientes, tratados conforme o caso. O raio X simples para avaliar a idade óssea deve ser feito em crianças e adolescentes, e a densitometria óssea, a cada 2 anos, para avaliação da densidade mineral óssea nos pacientes com mais de 18 anos (9,22,25). Nesta rotina de cuidados, monitorar o crescimento e o desenvolvimento nutricional, intelectual e neuropsicológico é mandatório.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bodamer O A. Overview of Phenylketonuria. UpToDate. Version 18.1. Jan 2010
2. Gambol P J. Maternal Phenylketonuria Syndrome and Case Management Implications. *Journal of Pediatric Nursing*. 2007;22:129-138.
3. Burgard P, Luo X, Hoffmann GF. Phenylketonuria. In *Pediatric Endocrinology and Inborn Errors of Metabolism*. Kyriakie Sarafoglou. McGrawHill.2009.
4. Brosco J P, Sanders L M, Seider M I, Dunn A C. Adverse Medical Outcomes of Early Newborn Screening Programs for Phenylketonuria. *Pediatrics* 2008; 122: 192-197.
5. Burton B K, Grange D K, Milanowski A, Vockley G, Crombez E A, Abadie V, Harding C O, Cederbaum S, Dobbelaere D, Smith A, Dorenbaum A. The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study. *J Inher Metab Dis* 2007; 30:700-707.
6. Kalkanoglu H S, Kirsten K A, Sertkaya D, Møller L B, Romstad A, Mikkelsen I, Guldberg P, Lou H C & Güttler F. Behavioural effects of phenylalanine-free amino acid tablet supplementation in intellectually disabled adults with untreated phenylketonuria. *Acta Paediatrica* 2005; 94: 1218-1222.
7. Vallian S, Barahimi E, Moeini H. Phenylketonuria in Iranian population: a study in institutions for mentally retarded in Isfahan. *Mutation Research* 2003 May, 15; 526: 45-52.
8. Albrecht A, Garbade SF, Burgard P. Neuropsychological speed tests and blood phenylalanine levels in patients with phenylketonuria: A meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2009;33:414-421.
9. Mitchell JJ, Scriver CR. Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. *GeneReviews*.NCBI Bookshelf. Last Update: May 4, 2010.
10. Waisbren SE, Noel K, Fahrbach K, Cella C, Frame D, Dorenbaum A, Levy H. Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: A systematic literature review and metaanalysis. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2007;92:63-70.
11. Carvalho T M. Resultados do Levantamento Epidemiológico da Sociedade Brasileira de Triagem Neonatal (SBTN). *Ver Med Minas Gerais*. 2003; 13 (1 Supl 2):S109-35.
12. Monteiro L T B, Cândido L M B. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos - Phenylketonuria in Brazil: evolution and cases. *Rev. Nutr.* 2006, May/Jun; 19.
13. Campistol Plana J, Alvarez Dominguez L, Riverola de Veciana AT, Castillo Rivera P, Giner Soria P. Hiperfenilalaninemia y fenilcetonuria. Interés del diagnóstico precoz y seguimiento de La enfermedad en un centro de referencial. *An. Esp. Pediatr.* 1991; 34; 1:51-56.
14. Güttler F. Phenylketonuria: 50 Years since Følling's Discovery and still Expanding our Clinical and Biochemical Knowledge. *Acta Paediatr Scand* 1984; 73:705-716.
15. Peng S S-F, Tseng W-Y I, Chien Y-H, Hwu W-L, Liu H-M. Diffusion Tensor Images in Children with Early-Treated, Chronic, Malignant Phenylketonuria: Correlation with Intelligence Assessment. *Am J Neuroradiol*. 2004 Oct; 25 (9): 1569-74.
16. Schuett V. U.S. FNC Screening and Treatment Guidelines. Last update Jan/2003. National FNC News: www.FNCnews.org
17. Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, Byck S, Nowacki P, Scriver CR. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalyses of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet*. 1997; 61: 1309-17 [PubMed]
18. Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, François B, Michiels L, Ullrich K, Hoffmann GF, Burgard P, Schmidt H, Meli C, Riva E, Dianzani I, Ponzzone A, Rey J, Güttler F. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet*. 1998; 63:71-9 [Pub-Med]
19. Scriver, C., & Kaufmann, S. (2001). Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine hydroxylase deficiency. In C., Scriver, A., Sly, W., Sly, & D., Valle (Eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease* (pp.1667-1707). New York: McGraw-Hill.
20. Mira N V M, Marquez U M L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria - Diagnoses and treatment of phenilketonuria. *Revista de Saúde Pública*. 2000, Feb; 34.
21. Santos LL, Magalhães MC, Januário JN, Aguiar JB, Carvalho MRS. The time has come: a new scene for FNC treatment. *Genetics and Molecular Research*. 2006;5(1):33-44.
22. Osório, H G, Silva, I W, Feferbaum R. Fenilcetonúria: da restrição dietética à inclusão socioeconômica. Phenylketonuria: from the dietary restriction to social-economic inclusion. *Rev Bras Nutr Clin* 2008; 23(2):104-10.
23. Yu JS. Phenylketonuria: a review. *Postgraduate Medical Journal*. 1970; 46:430-446.
24. Poustie VJ, Wildgoose J. Dietary interventions for phenylketonuria. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010, Issue 1. Art. No.: CD001304.DOI:10.1002/14651858.CD001304.pub2
25. Van Spronsen F J, Burgard P. The truth of treating patients with phenylketonuria after childhood: The need for a new guideline. *J Inher Metab Dis*. 2008; 31: 673-679.
26. Scriver C R. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Hum Mutation*. 2007; 28 (9): 831-845.

27. Burgard P. Development of intelligence in early treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 2000; 159 [Suppl2]:S74-S79.
28. Yi SHL, Singh RH. Protein substitute for children and adults with phenylketonuria. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2010, In: The Cochrane Library, Issue 4, Art.No.CD004731. DOI: 10.1002/14651858.CD004731.pub4
29. Lindner M, Gramer G, Garbade S F, Burgard P. Blood phenylalanine concentrations in patients with PAH-deficient hyperphenylalaninaemia off diet without and with three different single oral doses of tetrahydrobiopterin: Assessing responsiveness in a model of statistical process control. *J Inherit Metab Dis.* 2009; 32:514-522.
30. Management of FNC. A consensus document for the diagnosis and management of children, adolescents and adults with phenylketonuria. NSFNC - The National Society for Phenylketonuria (United Kingdom), 2004.
31. MacDonald A, Asplin D. Phenylketonuria: practical dietary management. *J Fam Health Care* 2006; 16(3):83-5.
32. Cornejo V, Manriquez V, Colombo M, Mabe P, Jiménez M, De la Parra A, et al. Phenylketonuria diagnosed during the neonatal period and breast feeding. *Rev Med Chil* 2003; 131(11):1280-7.
33. Kanufre V, Starling ALP, Leão E, Aguiar MJB, Santos JS, Soares RDL, Silveira AM. Breastfeeding in the treatment of children with phenylketonuria. *Jornal de Pediatria.* 2007; 83(5):447-452.
34. Feillet F, Clarke L, Meli C, Lipson M, Morris A A, Harmatz P, Mould D R, Green B, Dorebaum A, Giovannini M, Foehr E. Pharmacokinetics of Sapropterin in Patients with Phenylketonuria. *Clin Pharmacokinet.* 2008; 47 (12):817-25.
35. Koch R, Burton B, Hoganson G, Peterson R, Rhead W, Rouse B, Scott R, Wolff J, Stern AM, Guttler F, Nelson M, De La Cruz F, Coldwell J, Erbe R, Geraghty MT, Shear C, Thomas J and Azen C. Phenylketonuria in adulthood: A collaborative study. *J Inherit. Metab. Dis.* 2005; 25:333-346.
36. Acosta P B, Yannicelli S, Singh E, et al. Nutrient intakes and physical growth of children with phenylketonuria undergoing nutrition therapy. *J Am Diet Assoc.* 2003; 103:1167-1173.
37. Huemer M, Huemer C, Möslinger D, Huter D, Stöckler-Ipsiroglu S. Growth and body composition in children with classical phenylketonuria: results in 34 patients and review of the literature. *J Inherit Metab Dis.* 2007; 30: 694-699.
38. Lee PJ, Amos A, Robertson, et al. Adults with late diagnosed FNC and severe challenging behavior: a randomised placebo-controlled trial of a phenylalanine-restricted diet. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 80: 631-635.
39. Murphy GH, Johnson SM, Amos A, Weetch E, Hoskin R, Fitzgerald B, Lilburn M, Robertson L and Lee P. Adults with untreated phenylketonuria: out of sight, out of mind. *The British Journal of Psychiatry* 2008; 193, 501-502.
40. Dion E, Prévost MJ, Carrière S, Babin C and Goisneau J. Phenylalanine restricted diet treatment of the aggressive behaviours of a person with mental retardation. *The British Journal of Development Disabilities.* 2001; 47(92):21-29
41. MacDonald A, Rylance G, Davies P, Asplin D, Hall SK, Booth IW. Free use of fruits and vegetables in phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2003;26:327-338.
42. MacDonald A, Lilburn M, Davies P, Evans S, Daly A, Hall SK, Hendriksz C, Chakrapani A, Lee P. "Ready to drink" protein substitute is easier for people with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 2006; 29:526-531.
43. Rohr FJ, Munier AW, Levy HL. Acceptability of a new modular protein substitute for the dietary treatment of phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2001; 24:623-630.
44. MacDonald A, Rylance G, Davies P, Asplin D, Hall SK, Booth IW. Administration of protein substitute and quality of control in phenylketonuria: A randomized study. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2003; 26:319-326.
45. Cockburn F, Barwell B, Brenton D. Recommendations on the dietary management of phenylketonuria. Report of Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria. *Arch Dis Child* 1993;68(3):426-7
46. Durham-Shearer SJ, Judd PA, Whelan K, Thomas JE. Knowledge, compliance and serum phenylalanine concentrations in adolescents and adults with phenylketonuria and the effect of a patient-focused educational resource. *Journal of Human Nutrition and Dietetics.* 2008;21:474-485.
47. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Phenylketonuria: screening and management. October 16-18, 2000. *Pediatrics* 2001; 108:972.
48. Blau N, Blaskovics M. Hyperphenylalaninemia. In: Blau N, Duran M, Blaskovics M, eds. *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases.* London: Chapman & Hall, 1996: 65-78.

ANEXO 3
TÉCNICA DE COLETA EM PAPEL FILTRO PARA O
"TESTE DO PEZINHO" EM RECÉM-NASCIDOS

TÉCNICA DE COLETA EM PAPEL FILTRO PARA O "TESTE DO PEZINHO" EM RECÉM-NASCIDOS

1. Identificar a área da punção na região do calcanhar do recém-nascido (fig. 01). Realizar a punção dentro da área correspondente a da figura.
2. Massagear o calcanhar do recém-nato suavemente. Limpar a área a ser puncionada com álcool a 70%, deixando-o evaporar totalmente (fig. 02). Não fazer uso de substâncias iodadas que podem interferir no resultado dos exames.
3. Massagear também, e suavemente,,o membro inferior correspondente à área da coleta em direção à extremidade para facilitar o fluxo de sangue na região (fig. 03).
4. Puncionar o calcanhar num só movimento contínuo quase perpendicular à superfície da pele (fig. 04).
5. Permitir a formação de uma grande gota de sangue, evitando, no entanto, que se forme coágulo (fig. 05).
6. Encostar a gota de sangue no centro do círculo do papel filtro, deixando-o impregnar o papel totalmente até o verso (fig. 06). Amostras em que o verso do papel de filtro não está adequadamente impregnado, são consideradas insuficientes por não apresentar a quantidade necessária de sangue.
7. Aguardar uma nova gota de sangue para preencher o próximo círculo do papel e assim sucessivamente até que todos os círculos sejam preenchidos (fig. 07).
8. Concluída a coleta, pressionar a área da punção com algodão seco e fixar bandagem antisséptica (fig. 08).
9. Após a coleta, a amostra deve ser mantida em temperatura ambiente para a secagem por pelo menos 02 horas. Após a secagem total da amostra, esta pode ser acondicionada nos envelopes específicos para o envio ao laboratório.

10. Não deixar a amostra em contato com produtos líquidos (nem mesmo água que hemolisa a mostra), gases ou qualquer outra substância que possa causar contaminação da mesma. Amostra mal coletada ou mal acondicionada determina a reconvocação para uma nova coleta, que além do transtorno para a mãe e desconforto para a criança, causa atraso de resultado e aumento de custo operacional.



ANEXO 4**FICHA DE COLETA PARA O TESTE DO PEZINHO - FEPE**

FICHA DE COLETA PARA O TESTE DO PEZINHO - FEPE

FEPE - FUNDAÇÃO ECUMÊNICA DE PROTEÇÃO AO EXCEPCIONAL - (41) 262-3443
TESTE DO PEZINHO

NO MEU COMPLETO E LIVEL DA MÃE: _____
 SO USE TINTA PRETA OU AZUL / PREENCHER COM LETRA DE FORMATA

NO MEU COMPLETO E LIVEL DA CRIANÇA: _____

NO MEU E SOBRENOME DO PAI: _____
 RUA: _____ Nº: _____
 BAIRRO: _____ FONE: _____
 CIDADE: _____ UF: _____
 CEP: _____

SEXO: ☐ M ☐ F
 PESO (GRAMAS): _____
 COR: ☐ BRANCA ☐ PRETA ☐ OUTRA _____
 FO AMAMENTADO COM LEITE? ☐ SIM ☐ NÃO

FEZ TRANSFUSÃO? ☐ SIM ☐ NÃO
 PREMATURO? ☐ SIM ☐ NÃO
 FORMAS GÊMITOS? ☐ SIM ☐ NÃO

CÓDIGO DO HOSPITAL OU UNIDADE DE SAÚDE _____

ESTA É A 1ª COLETA DO BEBÊ? ☐ SIM ☐ NÃO

NASCIMENTO: _____
 DIA: _____ MÊS: _____ ANO: _____
 COLETA: _____
 DIA: _____ MÊS: _____ ANO: _____

NO MEU COMPLETO E LIVEL DO COLETA: _____

HOSPITAL OU UNIDADE DE SAÚDE

COMPROVANTE DE COLETA

DECLARO QUE NA DATA DE _____ FUI INFORMADA DA COLETA DE SANGUE PARA OS TESTES DE TRIAGEM NEONATAL.

OBSERVAÇÃO: O HOSPITAL OU UNIDADE DE SAÚDE DEVE GUARDAR POR 6 MESES ESTE COMPROVANTE NO PRONTUÁRIO DA MÃE OU NENÊ.

CONFORME PORTARIA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE Nº 822, DE 06/06/2001.

ASSINATURA DA MÃE: _____

INFORMATIVO AO PAIS

SEU FILHO COLETOU NA ALTA DESTE HOSPITAL ALGUMAS GOTAS DE SANGUE (TESTE DO PEZINHO) PARA O EXAME GRATUITO DE QUATRO DOENÇAS, CHAMADAS DE FENILKETONÚRIA, HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO, HEMOGLOBINOPATIAS E FIBROSE CÍSTICA.

ELAS PODEM CAUSAR DEFICIÊNCIA MENTAL E OUTROS PROBLEMAS.

PROCURE O RESULTADO EM 15 DIAS NA SECRETARIA DA ENTIDADE ONDE COLETOU O SANGUE E DEIXOU O ENDEREÇO.

REPITA O EXAME QUANDO SOLICITADO - É GRATUITO E IMPORTANTE

VALIDADE 07/2004
 CONSERVE CORRETAMENTE
 S&S 903 - 1W001

FONTE: Centro de Pesquisas da FEPE

ANEXO 5
PROTOCOLO DE ANÁLISE PARA FAL NO PROGRAMA DE TRIAGEM
NEONATAL DO ESTADO DO PARANÁ (FEPE)

PROTOCOLO DE ANÁLISE PARA FAL NO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DO ESTADO DO PARANÁ (FEPE)

Primeira triagem fluorométrica	$\geq 0,2$ - $< 2,5$ $< 0,2$ $\geq 2,5$	Normal Repetir em uniplicata Repetir em duplicata
Segunda triagem fluorimétrica (repetição)	$> 0,2$ - $< 3,0$ $< 0,2$ $\geq 3,0$ $\geq 6,0$	Normal Repetir Suspeito - Reconvocar Suspeito - Consulta
Segunda amostra de sangue	$\geq 4,0$	Suspeito - Consulta
Terceira amostra de sangue	$\geq 3,0$ - $\leq 3,9$	Suspeito - Consulta

NOTA: Os valores numéricos indicam a concentração de Phe em mg/dL.

ANEXO 6

**EXPERIMENTO DE ALIMENTAÇÃO CONJUNTA: FÓRMULA E ALEITAMENTO
MATERNO – HC – SERVIÇO DE ENDÓCRINO-PEDIATRIA - UFPR**

**EXPERIMENTO DE ALIMENTAÇÃO CONJUNTA: FÓRMULA E ALEITAMENTO
MATERNO – HC – SERVIÇO DE ENDÓCRINO-PEDIATRIA - UFPR**

DN:12/03/2008	Fluorometria mg/dL	MS/MS mg/dL	Phe/Tyr
27/03/2008	11,87	18,80	13,96
03/04/2008	0,24	0,47	0,23
10/04/2008	1,99	2,86	2,34
17/04/2008	3,59	4,70	3,34
22/04/2008	3,42	5,14	3,88
06/05/2008	0,49	0,56	0,31
13/05/2008	0,59	1,18	1,30
20/05/2008	2,07	3,69	3,48
26/05/2008	2,38	5,12	4,87
09/06/2008	0,97	1,33	1,12

CRIANÇA DO SEXO FEMININO NATURAL DE ARAUCÁRIA. EXAMES COLETADOS SEMANALMENTE
FONTE: Amostras do período de 03 meses submetidas ao método fluorométrico e espectrométrico

ANEXO 7

**RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO DE FENILALANINA PELOS MÉTODOS DE
FLUOROMETRIA E DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS QUANDO SUBMETIDOS
AO CONTROLE DE QUALIDADE INTERNACIONAL CDC DE ATLANTA**

RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO DE FENILALANINA PELOS MÉTODOS DE FLUOROMETRIA E DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS QUANDO SUBMETIDOS AO CONTROLE DE QUALIDADE INTERNACIONAL CDC DE ATLANTA

Specimen No.		4151		4152		4153		4154		4155	
Expected Value		37.28		295.25		31.48		43.77		38.93	
Method Code	Method Name	Mean	N	Mean	N	Mean	N	Mean	N	Mean	N
22	Derivatized - MS/MS non-kit	43.02	105	271.97	107	38.83	106	53.16	106	43.24	104
38	Non-derivatized - MS/MS non-kit	49.61	27	304.97	27	42.79	28	60.02	28	47.37	28
60	Non-derivatized - MS/MS PerkinElmer NeoBase Kit	45.32	53	278.19	55	38.22	54	53.80	53	44.78	54
35	Derivatized - MS/MS PerkinElmer NeoGram Kit	49.87	25	292.60	25	41.73	24	57.12	25	45.78	24
56	Derivatized - MS/MS Chromsystems MassChrom Kit	41.99	6	263.56	6	37.12	6	51.97	5	44.40	6
61	Non-derivatized - MS/MS Chromsystems MassChrom Kit	55.05	9	349.25	9	48.04	9	66.40	9	54.27	9
47	Fluorometric manual (e.g., Hill, Misuma)	96.56	12	345.22	12	114.69	12	98.52	12	87.41	12
8	Colorimetric	103.20	1	333.30	1	127.26	1	60.60	1	72.72	1
9	PerkinElmer Neonatal Kit	75.04	30	290.89	28	61.84	30	75.15	31	59.73	29
23	Neo-Genesis Accuwell	59.45	2	333.52	2	68.57	2	51.01	2	25.36	2
24	Ani Labsystems	87.32	15	353.62	14	147.21	15	81.38	15	73.48	15
25	Bio-Rad Quantase	86.74	7	337.53	7	87.30	7	84.78	7	72.24	7
29	MP Biomedicals Enzyme Assay	94.40	2	248.71	3	216.95	2	102.40	2	132.50	2
34	Astoria-Pacific 50 Hour Reagent Kit	63.60	1	216.70	1	53.60	1	63.60	1	58.50	1
31	Interscientific Enzyme	62.84	6	243.64	6	65.58	6	60.88	6	50.08	5
43	TecnoSuma UMTEST	119.97	14	373.54	14	126.06	13	126.11	14	109.04	14
18	High-performance liquid chromatography (HPLC)	46.98	5	300.81	6	51.32	6	66.53	6	57.98	6
19	Other (Specify name and source)	36.05	5	321.13	5	42.14	5	45.92	5	40.97	5

ANEXO 8
O LABORATÓRIO DE TRIAGEM NEONATAL E AS DIRETRIZES
PARA O DIAGNÓSTICO DA FENILCETONÚRIA



**O laboratório de triagem neonatal e as diretrizes Brasileiras
para o diagnóstico da fenilcetonúria**

Journal:	<i>Jornal de Pediatria</i>
Manuscript ID:	JPED-2012-0189
Manuscript Type:	Original Article
Keywords:	Fenilcetonúria, Triagem neonatal, dosagem fenilalanina, diretrizes brasileiras

SCHOLARONE™
Manuscripts

Jornal Brasileiro de Pediatria

O laboratório de triagem neonatal e as diretrizes Brasileiras para o diagnóstico da fenilcetonúria.

The newborn screening laboratory and the Brazilian guidelines for phenylketonuria diagnosis

Regina M. Tokunaga^{1,2}, Yuri C. Sica², Mouseline T. Domingos², Izabella C.R. Santos¹, Henrique R. Frigeri¹, Rafaela A. Rocha¹, Dayane Alberton¹, Fabiane G. M. Rego¹, Geraldo Picheth^{1*}, Rosana M. Pereira¹

1 Universidade Federal do Paraná – Departamento de Pediatria do Hospital de Clínicas
2 Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE)

Endereço para correspondência:

*autor correspondente Geraldo Picheth,
E-mail: gpicheth@ufpr.br

Departamento de Patologia Médica,
Universidade Federal do Paraná
Rua Prefeito Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico
80210-170 Curitiba, PR, Brasil
Telefone/Fax: +55-41-3360-4067

Running title: PKU Brazilian guidelines

Resumo

A triagem para detecção da hiperfenilalaninemia e fenilcetonúria, teste do pezinho, são de responsabilidade dos centros de triagem neonatal. As diretrizes 2010 do Ministério da Saúde do Brasil recomendam novos de referência para a concentração de fenilalanina (Phe) em amostras de sangue seco (2,0 mg/dL). Este novo valor de corte é significativamente menor que o proposto na resolução anterior (4,0 mg/dL) de 1990. Neste estudo foi avaliado o impacto dos novos valores de corte utilizando os métodos fluorométrico automatizado e a espectrometria de massas em centro de triagem neonatal da Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional do Estado do Paraná. O projeto tem aprovação do Comitê de Ética da UFPR. A quantificação da Phe pelo ensaio espectrométrico (MS) apresentou resultados significativamente superiores ao fluorométrico e permitiu a quantificação da razão fenilalanina/tirosina (Phe/Tyr). Para o ensaio fluorométrico concentrações menores que 3,0 mg/dL de Phe identificaram todos os indivíduos sem a doença. Com o método espectrométrico o valor de corte foi 5,0 mg/dL para os mesmos indivíduos. Este estudo mostra que a nova diretriz do Ministério da Saúde, necessita ser avaliada com cautela. Os valores de corte para triagem da fenilcetonúria devem ser atrelados à metodologia empregada para evitar resultados falso-positivos e repetições desnecessárias e onerosas às instituições. Urge uma discussão ampla entre os especialistas na área para atualizar e validar os protocolos existentes, que forneçam aos centros de triagem uma diretriz unificada e homogeneidade no tratamento das divergências e intercorrências analíticas e diagnósticas.

Palavras-chaves: Fenilcetonúria, triagem neonatal, dosagem de fenilalanina, diretrizes.

Abstract

Screening for detection of hyperphenylalaninemia and phenylketonuria, newborn screening (neonatal heel prick), are the responsibility of neonatal screening centers. The 2010 guidelines of the Ministry of Health of Brazil recommend new reference for the concentration of phenylalanine (Phe) in dried blood samples (2.0 mg/dL). This new cutoff value is lower than that proposed in the previous resolution from 1990 (4.0 mg/dL). This study assessed the impact of the new cutoff using the automated fluorometric and mass spectrometry methods in newborn screening center of the Ecumenical Foundation for Protection of the Handicapped of the State of Paraná. The project is approved by the Ethics Committee of Universidade Federal do Paraná. The quantification of the assay Phe by mass spectrometry (MS) showed significantly higher values compared to fluorometric assay and allowed to quantify the ratio phenylalanine / tyrosine (Phe/Tyr). For the fluorometric assay, concentrations less than 3.0 mg/dL of Phe identify all individuals without the disease. To mass spectrometry method healthy individuals were identify with the cutoff value of 5.0 mg/dL. This study shows that the new guideline from the Ministry of Health needs to be evaluated carefully. The cutoff values for screening for phenylketonuria should be linked to the methodology employed to avoid false-positive results and unnecessary repetition and increase the costs for the institutions. We urgently need an extensive discussion among the experts in the field to update and validate the existing protocols. In addition, the neonatal screening centers need unified guidelines that answer how to standardize the procedures for use different analytical methods and diagnostics criteria.

Keywords: Phenylketonuria, newborn screening, levels of phenylalanine guidelines.

INTRODUÇÃO

A deficiência total ou parcial da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) responde por aproximadamente 98% dos casos de hiperfenilalaninemia. A PAH catalisa a conversão da fenilalanina (Phe) a tirosina (Tyr) e a deficiência severa desta enzima caracteriza a patologia fenilcetonúria (PKU) clássica^{1,2}.

A prevalência da PKU no Brasil é de 1:12.000 a 1:15.000 dos nascidos vivos, com predominância em caucasianos³. Esta frequência é próxima da média global para esta doença metabólica rara descrita como 1:10.000⁴. Na Europa, a frequência da PKU, a aminoacidopatia mais comum, é de 1:5.000 a 1:15.000^{5,6}.

O acúmulo de Phe em pacientes com PKU propicia a conversão deste aminoácido em fenilpiruvato, metabólito capaz de produzir lesão no sistema nervoso central e principal responsável pelas sequelas neurológicas dos afetados⁷.

No Brasil o diagnóstico da fenilcetonúria é realizado através de teste de triagem neonatal conhecido como “teste do pezinho”, gratuito e obrigatório em todo o território nacional, desde 13 de julho de 1990 com a Lei Federal no 8.069 - Estatuto da Criança e do Adolescente⁸. Em junho de 2001, através da Portaria do Ministério da Saúde MS/GM n.822, foi regulamentado a nível nacional o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). Novas diretrizes para o protocolo clínico e terapêutico na fenilcetonúria foram propostas no ano de 2010⁹. Entre as alterações propostas na nova versão esta a alteração significativa nos valores de referência para o diagnóstico da fenilcetonúria. O protocolo de 2002 propunha a suspeita de alteração na concentração da fenilalanina no sangue com valores acima de 4,0 mg/dL¹⁰ enquanto o as novas diretrizes de 2010 recomendam que concentrações superiores a 2,0 mg/dL como valores indicativos de alteração e reforçam a importância da relação fenilalanina/tirosina para o diagnóstico da PKU (Figura 1).

Neste estudo avaliamos os novos critérios propostos comparando com as referências utilizadas em nosso centro de triagem neonatal, bem como o desempenho das metodologias de fluorescência e espectrometria de massa na quantificação da fenilalanina e relação fenilalanina/tirosina. O projeto tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFPR.



Figura 1. Fluxograma para a caracterização da hiperfenilalaninemia comparando os valores de corte recomendados pelas diretrizes de 2002 e 2010 do Ministério da Saúde.

A expressiva diferença entre os valores de corte para a caracterização de suspeita de hiperfenilalaninemia e fenilcetonúria entre as duas diretrizes do Ministério da Saúde sugere que adotada a nova recomendação oficial (Portaria de 2010), as frequências da detecção destas patologias sejam alteradas, com possíveis reflexos em estudos epidemiológicos.

Vários Centros de Triagem Neonatal adotam, a longo tempo, um protocolo hierarquizado com base nas diretrizes do MS de 2002 (Portaria n. 847, de 31 de outubro de 2002) associando recomendações internacionais e valores de corte sugeridos pelos fabricantes dos reagentes e equipamentos utilizados para a quantificação da fenilalanina em amostra de sangue seco. A Tabela 1 mostra o protocolo utilizado pela Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE, Curitiba-PR, Brasil).

Tabela 1. Critérios hierarquizados para o diagnóstico da fenilcetonúria empregados na Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE) do Estado do Paraná.

Estágio	Fenilalanina* (mg/dL)	Critério [ação]
<u>Primeira triagem</u> (1º amostra de sangue)	$\geq 0,2$ e $< 2,5$	Normal [Liberar resultado]
	$< 0,2$ ou $\geq 2,5$	Repetir
Segunda dosagem [Repetição] (com a 1º amostra de sangue)	$> 0,2$ a $< 3,0$	Normal
	$< 0,2$	Repetir
	$\geq 3,0$ e $< 6,0$	Suspeito [Reconvocar]
	$\geq 6,0$	Suspeito [Consulta Médica]
<u>Segunda triagem</u> (2º amostra de sangue)	$> 3,0$ e $< 3,9$	Suspeito [Coletar nova amostra]
	$\geq 4,0$	Suspeito [Consulta Médica]
<u>Terceira triagem</u> (3º amostra de sangue)	$\geq 3,0$	Suspeito [Consulta Médica]

*Fenilalanina quantificada por método fluorométrico (Phe-F) automatizado.

Neste trabalho comparamos a quantificação da fenilalanina em amostras de sangue seco (teste do pezinho) por dois métodos em três grupos de indivíduos, classificados pela concentração de fenilalanina em saudáveis, limítrofes e portadores de fenilcetonúria. O impacto dos novos critérios para a triagem da fenilcetonúria⁹ são discutidos e comparados com os protocolos estabelecidos e em uso por centro de triagem neonatal.

MÉTODOS

As amostras de sangue seco foram obtidas na Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE) de Curitiba, entidade que realiza a triagem neonatal de todo o Estado do Paraná. Todas as amostras foram coletadas após 48 horas do nascimento, segundo informações preenchidas pela unidade hospitalar, previamente orientada pelo serviço de enfermagem da FEPE, quanto à importância da ingestão de leite, pelo recém-nascido, antes da coleta. Todas as amostras foram coletadas no período de 2008 a 2009.

As amostras em estudo são provenientes de recém-natos e crianças com peso ao nascer igual ou superior a 2,5 kg, foram classificadas em três grupos, arbitrariamente

designados, conforme a concentração de fenilalanina (Phe) quantificada por método fluorimétrico e os critérios do protocolo de liberação mostrados na Tabela 1:

(1) grupo normal (n=114): recém-natos saudáveis, com resultado de Phe normal, liberado sem repetição, seguindo o protocolo da FEPE (Tabela 1). Este grupo representa 99,8% do total de resultados na rotina do FEPE.

(2) grupo suspeito (n=80): recém-natos cujos resultados foram liberados após necessária repetição da dosagem (Tabela 1), com concentração de Phe $\geq 2,1$ e $< 3,0$ mg/dL, e confirmação da concentração com a mesma amostra. Todos os indivíduos deste grupo foram negativos para PKU e estes resultados representam aproximadamente 0,2% do total de amostras analisadas pelo FEPE.

(3) grupo fenilcetonúrico (PKU, n=123): crianças e adolescentes com diagnóstico clínico de fenilcetonúria, em tratamento, cujas amostras foram coletadas durante na rotina de acompanhamento.

As determinações de fenilalanina foram realizadas nas mesmas amostras com duas metodologias distintas. O sistema automatizado com detecção fluorométrica (*Wallac Neonatal Phenylalanine kit, PerkinElmer*) foi comparado com o método por espectrometria de massas com diluição isotópica (*NeoGram Amino Acids and Acylcarnitines Non-derivatized Tandem Mass Spectrometry Kit, Micro Mass QuattroMicro, PerkinElmer*). A metodologia espectrométrica empregada permite quantificar simultaneamente a concentração de tirosina e estabelecer a razão fenilalanina/tirosina, parâmetro também utilizado neste estudo e de relevância no auxílio ao diagnóstico da fenilcetonúria.

As calibrações e controles de qualidade dos dois sistemas em estudo foram processados conforme as recomendações dos fabricantes dos equipamentos. Os coeficientes de variação interensaio (n=20) para os dois métodos, com base em amostras com concentração normal de fenilalanina foram 23%, 12% e 21%, respectivamente para os ensaios fluorométrico, espectrometria de massas e relação fenilalanina/tirosina.

As estatísticas descritivas, análises de correlação, análise de variância (ANOVA), teste t-Student para amostras não pareadas foram empregadas no estudo. As concentrações de fenilalanina (fluorescência e espectroscopia de massas), bem como a razão Phe/Tyr não apresentaram distribuição normal avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Estes parâmetros foram descritos pela mediana e a dispersão por

25%-75% da região interquartil. As variáveis contínuas sem distribuição normal foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis (ANOVA mediana). Variáveis qualitativas foram comparadas como o teste do chi-quadrado. O programa Statistica para Windows versão 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OH, USA) foi utilizado em todas as análises. Um valor de probabilidade menor que 5% ($p < 0,05$) foi considerado significativo em todas as análises.

RESULTADOS

As características dos grupos em estudo estão descritas na Tabela 2.

Os grupos não apresentaram diferenças significativas quanto a sexo e etnia. A idade diferiu entre os grupos sendo o grupo controle significativamente mais jovem que os demais.

As concentrações de fenilalanina para os métodos em estudo foram significativamente diferentes entre os grupos ($p < 0,001$).

A razão fenilalanina/tirosina também foi significativamente diferente ($p < 0,001$) entre os grupos em estudo.

Quando comparadas as médias do método fluorométrico, tomado como referência (100%), com o método por espectrometria de massa, este apresentou incremento nos valores de 152% (1,32/0,87), 149% (3,73/2,49) e 116% (10,83/9,32) respectivamente para os grupos controle, limítrofe e PKU. Estas diferenças são significativas ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis).

As respostas a diferentes valores de corte para fenilalanina são mostrados na Figura 2. Quando o método fluorescentes é avaliado (Figura 2A) os grupos controle e suspeito tem 100% dos seus indivíduos agrupados respectivamente nas concentrações de Phe-F abaixo de 2,5 e 3,0 mg/dL. Cerca de 14% de pacientes com PKU apresentaram concentrações de Phe-F abaixo de 3,0 mg/dL.

Quando o método por espectrometria de massas é avaliado (Figura 2B) os grupos controle e suspeito apresentaram a totalidade dos seus indivíduos apresentando concentrações de Phe-MS menores que, respectivamente, 3,5 e 5,0 mg/dL. Cerca de 20% dos pacientes com PKU apresentaram concentrações de Phe-MS abaixo de 5,0 mg/dL. Portanto, os valores de corte foram significativamente diferentes para os métodos em estudo.

A razão fenilalanina/tirosina obtida com o método espectrométrico acima de 3,5 discriminou completamente os grupos controle e suspeito (Figura 3). Este valor de corte incluiu cerca de 10% de pacientes com PKU.

Tabela 2. Características antropométricas e laboratoriais dos grupos em estudo.

Parâmetros	GRUPOS (n=317)			p
	Controles (n=114)	Suspeito (n=80)	PKU (n=123)	
Sexo (H/M, %)	43/57	51/49	46/54	0,30*
Etnia (Euro/Afro, %)	87,9/12,1	96,3/3,7	91,2/8,8	0,08*
Idade	2,40±0,6 dias	16,3±5,9 dias	9,2±7,9 anos	<0,001 ^a
Phe-F (mg/dL)	0,80(0,6-1,7)	2,39(2,1-2,7)	8,52(5,4-12,3)	<0,001
Phe-MS (mg/dL)	1,23(1,1-1,4)	3,33(2,9-3,9)	10,0(7,1-14,3)	<0,001
Razão Phe/Tyr (MS)	0,82(0,6-1,1)	1,11(0,8-1,8)	15,2(3,5-23,6)	<0,001

H= homens; M=mulheres; Euro=Euro-Brasileiros; Afro=Afro-Brasileiros.

Phe= concentração de fenilalanina quantificada por métodos fluorométrico (Phe-F) ou espectrometria de massas (Phe-MS).

Razão Phe/Tyr= razão fenilalanina/tirosina obtida com o método espectrométrico (MS).

Os valores apresentados para os ensaios laboratoriais representam a média ± 1-desvio padrão ou mediana (25-75% da região interquartil).

Valores de probabilidade obtidos por ^aANOVA e os demais por Kruskal-Wallis.

* probabilidade, teste do chi-quadrado.

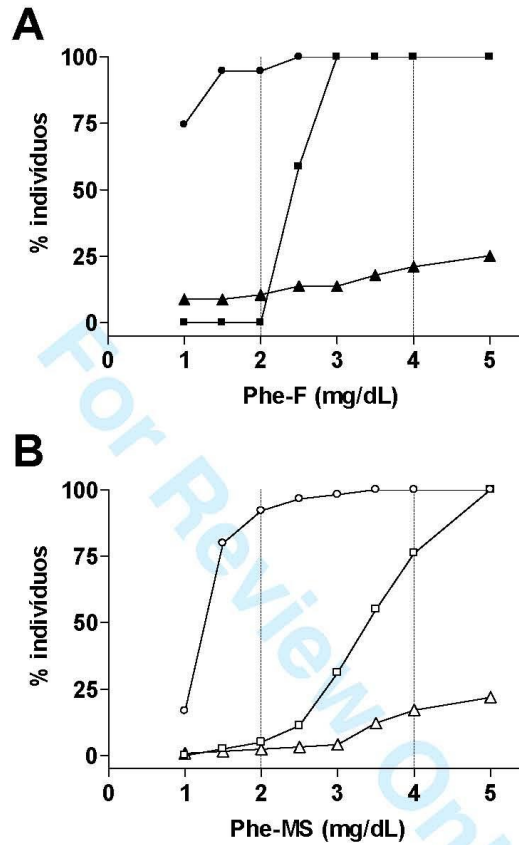


Figura 2. Efeito dos diferentes valores de corte para fenilalanina com os métodos em estudo.

A frequência de indivíduos (%) com concentrações de fenilalanina abaixo dos diferentes valores de corte estudados são apresentadas para os métodos fluorescente (Phe-F) e espectrométrico (Phe-MS).

A. Fenilalanina quantificada com método fluorescente (símbolos fechados).

B. Fenilalanina quantificada por espectrometria de massa (símbolos abertos).

Símbolos: círculo, grupo controle; quadrado, grupo suspeito e triângulo, grupo PKU. As linhas tracejadas destacam as concentrações de 2,0 mg/dL e 4,0 mg/dL, respectivamente os valores de corte preconizados para saudáveis pelas portarias do Ministério da Saúde de 2010 e 2002, respectivamente.

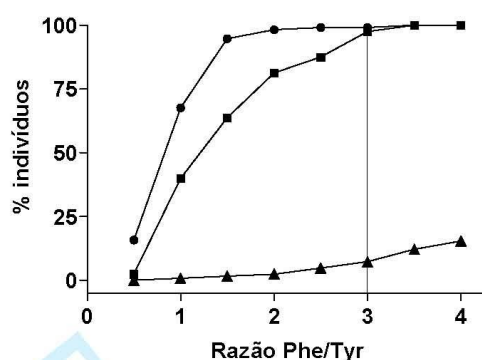


Figura 3. Efeito de diferentes valores de corte da razão fenilalanina/tirosina (Phe/Tyr) nos grupos em estudo.

Símbolos: grupo saudável, círculo; grupo suspeito, quadrado e grupo PKU, triângulo.

A linha tracejada destaca a razão Phe/Tyr de 3,0 valor de corte preconizado para saudáveis pela portaria do Ministério da Saúde 2010.

DISCUSSÃO

O diagnóstico e tratamento precoces da fenilcetonúria (PKU) tem impacto na evolução da patologia e na prevenção de sequelas irreversíveis dos afetados caso estes não sejam apropriadamente tratados^{3, 11, 12}. A obrigatoriedade do “teste do pezinho” em todo o território nacional, que entre os ensaios realizados exige a triagem para a fenilcetonúria, explicita a relevância desta patologia para a Saúde Pública.

Centros de triagem neonatal que utilizam o ensaio fluorométrico para a quantificação da fenilalanina em amostras de sangue seco têm buscado alternativas a esta metodologia através de novos procedimentos que apresentem elevada especificidade e versatilidade nas análises de detecção de erros inatos do metabolismo.

A espectrometria de massas se apresenta como excelente alternativa para os ensaios tradicionais no diagnóstico da fenilcetonúria, por apresentar elevadas sensibilidade e especificidade associada. Também este método possibilita identificar outros analitos de forma simultânea e totalmente automatizado da mesma amostra utilizada para a triagem de fenilcetonúria. Neste contexto, a comparação do tradicional

procedimento fluorométrico automatizado com as análises propiciadas por espectrometria de massas, foi um dos objetivos deste trabalho.

Também observamos que os valores de referência para a triagem da fenilcetonúria, preconizados pelo Ministério da Saúde, apresentam significativas diferenças daqueles observados em outras publicações¹¹⁻¹³.

Os indivíduos em estudo apresentaram distribuição semelhante entre homens e mulheres e representam essencialmente o grupo Euro-Brasileiro (>85%).

As duas metodologias em estudo apresentam valores diferentes para a fenilalanina em sangue seco (Tabela 2). Com método espectrométrico as concentrações de Phe foram superiores ao ensaio fluorométrico em todos os grupos em estudo.

A diferença nos valores da concentração de fenilalanina entre os métodos em estudo pode ser atribuída aos diferentes princípios metodológicos, aonde a presença de interferentes e a especificidade diferem entre os métodos¹⁴⁻¹⁷. Ao ensaio de espectrometria de massas com diluição isotópica, utilizado neste estudo, são atribuídas características de elevada especificidade, maior reprodutibilidade e menor susceptibilidade a interferentes quando comparado ao ensaio fluorométrico. Também a capacidade de recuperação da fenilalanina da amostra de sangue seco, pode ser uma característica diferencial entre os métodos^{15,16}.

Portanto, instituições que desejem substituir o ensaio fluorométrico pelo de espectrometria de massas devem atentar para a necessidade de estabelecer novos valores de referência, as dificuldades com a rastreabilidade e comparações com os resultados antigos. Também deve ser previsto um programa de treinamento de toda a equipe para a assimilação dos valores de corte para a fenilalanina com a nova metodologia, além de avaliar o custo-benefício deste investimento, quando utilizado apenas para a triagem da fenilcetonúria^{18,19}.

Este estudo mostra que os grupos controle e suspeito foram totalmente discriminados com concentração de Phe de 3,0 mg/dL quando considerado o método fluorométrico em estudo (Figura 2A). Este achado era esperado uma vez que a classificação dos grupos foi realizada com os critérios da FEPE (Tabela 1) onde 3,0 mg/dL é o limite superior usual. Para os mesmos grupos, o método espectrométrico apresentou valor discriminante expressivamente superior com 5,0 mg/dL (Figura 2B). Para ambas as metodologias empregadas, a aplicação do valor de corte proposto pela nova diretriz do Ministério da Saúde⁹, inferior a 2,0 mg/dL, promoveria um expressivo aumento no número de falso-positivos.

1
2
3 No entanto, os indivíduos selecionados em grupo suspeito não apresentam
4 fenilcetonúria pelos critérios estabelecidos pela FEPE e outros centros de triagem
5 neonatal. Na experiência da FEPE, com mais de três milhões de análises realizadas com
6 o método fluorométrico, nenhum indivíduo foi diagnosticado com fenilcetonúria
7 apresentando concentração de Phe menor que 3,0 mg/dL (dados não publicados). A
8 repetição do ensaio com na mesma amostra para este grupo limítrofe, como preconizado
9 na Tabela 1, é parte do programa de Controle de Qualidade para garantir a consistência
10 dos resultados, uma vez que como ensaio de triagem a determinação de Phe é passível
11 de variação analítica expressiva.

12
13 Neste contexto, a diretriz de 2010 do Ministério da Saúde⁹, não fornece
14 orientação sobre como proceder com os resultados acima do valor de corte (2,0 mg/dL),
15 mas que não atingiram os critérios estabelecidos para caracterizar a hiperfenilalaninemia
16 ou mesmo fenilcetonúria com implicações clínicas. Portanto, a aplicação linear dos
17 valores de referência propostos por esta diretriz, desconsiderando as características do
18 método de análise (especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade, falso-positivos e
19 falso-negativos), poderá levar a um expressivo aumento de resultados falso-positivos.
20 Também, as esperadas reconvocações de pacientes e novas determinações poderão ter
21 impacto no aumento da carga de trabalho dos profissionais, no estresse das famílias
22 envolvidas, bem como nos custos dos programas de triagem neonatal.

23 Também a razão Phe/Tyr menor que 3,0 recomendada na Diretriz de 2010 como
24 critério de exclusão para o diagnóstico da fenilcetonúria, deve ser revista. Neste estudo,
25 somente razões de Phe/Tyr superiores a 3,5 discriminaram completamente os grupos
26 controle e suspeito (Figura 3). Outros estudos apontam a superioridade da razão Phe/Tyr
27 para a triagem neonatal^{9, 15, 17, 20, 21}. Com relação ao uso da relação Phe/Tyr na triagem
28 neonatal, neste estudo, dois pontos devem ser discutidos. Primeiro, o tamanho amostral
29 do estudo e os critérios de classificação dos grupos podem mascarar possíveis
30 resultados falso-positivos ou falso-negativos, sendo recomendado ampliar o estudo para
31 uma análise mais consistente do valor de corte proposto para a relação Phe/Tyr. O
32 segundo elemento essencial que deve ser ressaltado, é que apenas os centros de triagem
33 que disponham de espectrômetros de massas, poderão fornecer resultados da relação da
34 Phe/Tyr. Este parâmetro, portanto, não estará disponível em muitas instituições de
35 triagem neonatal, e o custo elevado dos equipamentos e reagentes para o ensaio
36 espectrométrico seguramente podem ser um empecilho para a popularização do ensaio.

Em síntese, este estudo mostra que a nova diretriz do Ministério da Saúde⁹, que propõe a redução do valor de corte da concentração de fenilalanina de 4,0 mg/dL para 2,0 mg/dL necessita ser melhor avaliada. A redução dos valores de corte pode ser adequada para as novas metodologias disponíveis, mais específicas e sensíveis. No entanto, a referida diretriz não contempla uma análise mais aprofundada sobre a adequação dos valores de corte à metodologia empregada nos diferentes centros de triagem, bem como qual o tratamento deve ser aplicada aquelas amostras que se encontram acima da referencia para evitar resultados falso-positivos e repetições desnecessárias e onerosas as instituições. Urge uma discussão ampla entre os especialistas na área para atualizar e validar os protocolos existentes, que forneçam aos centros de triagem uma diretriz unificada e homogeneidade no tratamento das divergências e intercorrências analíticas e diagnósticas.

REFERÊNCIAS

1. Mira NVM, Marquez UML. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. Rev Saúde Pública. 2000;34(1):86-96.

2. Scriver CR, Kaufman S. The Metabolic e Molecular Bases of Inherited Disease. 8 ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
3. Monteiro LTB, Cândido LMB. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. Rev Nutr. 2005;19(3):381-7.
4. Albrecht J, Garbade SF, Burgard P. Neuropsychological speed tests and blood phenylalanine levels in patients with phenylketonuria: a meta-analysis. Neuroscience and biobehavioral reviews. 2009;33(3):414-21. Epub 2008/11/29.
5. Birk Moller L, Nygren AO, Scott P, Hougaard P, Bieber Nielsen J, Hartmann C, et al. Low proportion of whole exon deletions causing phenylketonuria in Denmark and Germany. Hum Mutat. 2007;28(2):207. Epub 2007/01/16.
6. Zschocke J, Haverkamp T, Moller LB. Clinical utility gene card for: Phenylketonuria. Eur J Hum Genet. 2011. Epub 2011/09/15.
7. Vilarinho L, Queirós A, Leandro P, Almeida IT, Rivera I. Fenilcetonúria revisitada. Arq Med. 2006;20(5-6):161-72.
8. BRASIL. Lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990. Dispõe sobre o Estatuto da Criança e do Adolescente e dá outras providências. 1990 [cited 2011 12 dez. 2011]; Available from: <<http://www2.camara.gov.br/legin/fed/lei/1990/lei-8069-13-julho-1990-372211-normaatuizada-pl.pdf>>.
9. SAÚDE. Portaria nº 712 de 17 de Dezembro de 2010. 2010 [cited 2011 14 dez. 2011]; Available from: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pedt_fenilcetonuria.pdf>.
10. SAÚDE. Portaria nº 847 de 06 de Novembro de 2002. 2002 [cited 2011 14 dez. 2011]; Available from: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/PORT2002/PT-847.htm>>.
11. Cornejo VE, Raimann EB. Errores innatos del metabolismo de los aminoácidos. Santiago do Chile: Universitaria; 1999.
12. Feillet F. [Phenylketonuria]. Presse Med. 2006;35(3 Pt 2):502-8. Epub 2006/03/22. Phenylcetonurie.
13. de Baulny HO, Abadie V, Feillet F, de Parseau L. Management of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. J Nutr. 2007;137(6 Suppl 1):1561S-3S; discussion 73S-75S. Epub 2007/05/22.
14. Ceglarek U, Muller P, Stach B, Buhrdel P, Thiery J, Kiess W. Validation of the phenylalanine/tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry: sensitive newborn screening for phenylketonuria. Clin Chem Lab Med. 2002;40(7):693-7. Epub 2002/09/21.

15. Chace DH, Kalas TA. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clin Biochem.* 2005;38(4):296-309. Epub 2005/03/16.
16. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002;3:17-45. Epub 2002/07/27.
17. Chace DH, Millington DS, Terada N, Kahler SG, Roe CR, Hofman LF. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 1993;39(1):66-71. Epub 1993/01/01.
18. Feuchtbaum L, Lorey F, Faulkner L, Sherwin J, Currier R, Bhandal A, et al. California's experience implementing a pilot newborn supplemental screening program using tandem mass spectrometry. *Pediatrics.* 2006;117(5 Pt 2):S261-9. Epub 2006/06/01.
19. Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med.* 2003;348(23):2304-12. Epub 2003/06/06.
20. Humphrey M, Nation J, Francis I, Boneh A. Effect of tetrahydrobiopterin on Phe/Tyr ratios and variation in Phe levels in tetrahydrobiopterin responsive PKU patients. *Mol Genet Metab.* 2011;104(1-2):89-92. Epub 2011/06/01.
21. Luciana M, Sullivan J, Nelson CA. Associations between phenylalanine-to-tyrosine ratios and performance on tests of neuropsychological function in adolescents treated early and continuously for phenylketonuria. *Child development.* 2001;72(6):1637-52. Epub 2002/01/05.



Figura 1. Fluxograma para a caracterização da hiperfenilalaninemia comparando os valores de corte recomendados pelas diretrizes de 2002 e 2010 do Ministério da Saúde.

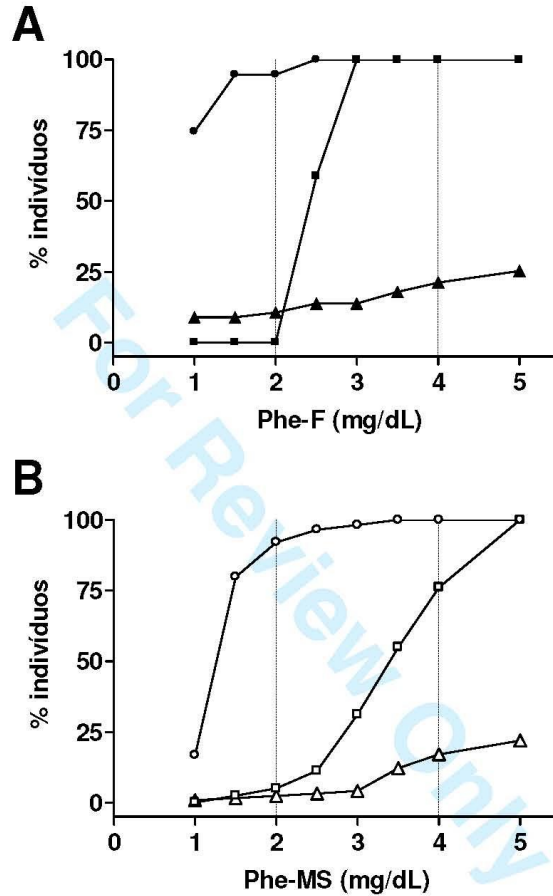


Figura 2. Efeito dos diferentes valores de corte para fenilalanina com os métodos em estudo.

A frequência de indivíduos (%) com concentrações de fenilalanina abaixo dos diferentes valores de corte estudados são apresentados para os métodos fluorescente (Phe-F) e espectrométrico (Phe-MS).

A. Fenilalanina quantificada com método fluorescente (símbolos fechados).

B. Fenilalanina quantificada por espectrometria de massa (símbolos abertos).

Símbolos: círculo, grupo controle; quadrado, grupo suspeito e triângulo, grupo PKU. As linhas tracejadas destacam as concentrações de 2,0 mg/dL e 4,0 mg/dL, respectivamente os valores de corte preconizados para saudáveis pelas portarias do Ministério da Saúde de 2010 e 2002, respectivamente.

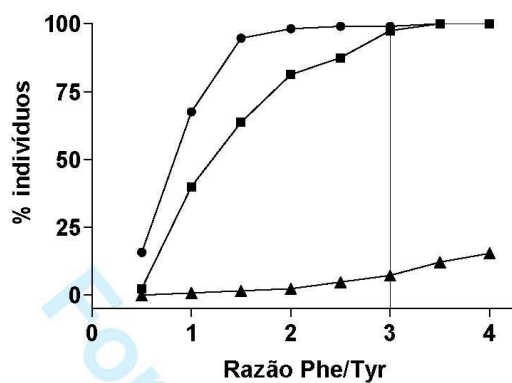


Figura 3. Efeito de diferentes valores de corte da razão fenilalanina/tirosina (Phe/Tyr) nos grupos em estudo.

Símbolos: grupo saudável, círculo; grupo suspeito, quadrado e grupo PKU, triângulo.

A linha tracejada destaca a razão Phe/Tyr de 3,0 valor de corte preconizado para saudáveis pela portaria do Ministério da Saúde 2010.

Tabela 1. Critérios hierarquizados para o diagnóstico da fenilcetonúria empregados na Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE) do Estado do Paraná.

Estágio	Fenilalanina* (mg/dL)	Critério [ação]
<u>Primeira triagem</u> (1º amostra de sangue)	$\geq 0,2$ e $< 2,5$	Normal [Liberar resultado]
	$< 0,2$ ou $\geq 2,5$	Repetir
Segunda dosagem [Repetição] (com a 1º amostra de sangue)	$> 0,2$ a $< 3,0$	Normal
	$< 0,2$	Repetir
	$\geq 3,0$ e $< 6,0$	Suspeito [Reconvocar]
	$\geq 6,0$	Suspeito [Consulta Médica]
<u>Segunda triagem</u> (2º amostra de sangue)	$> 3,0$ e $< 3,9$	Suspeito [Coletar nova amostra]
	$\geq 4,0$	Suspeito [Consulta Médica]
<u>Terceira triagem</u> (3º amostra de sangue)	$\geq 3,0$	Suspeito [Consulta Médica]

*Fenilalanina quantificada por método fluorométrico (Phe-F) automatizado.

Tabela 2. Características antropométricas e laboratoriais dos grupos em estudo.

Parâmetros	GRUPOS (n=317)			p
	Controles (n=114)	Suspeito (n=80)	PKU (n=123)	
Sexo (H/M, %)	43/57	51/49	46/54	0,30*
Etnia (Euro/Afro, %)	87,9/12,1	96,3/3,7	91,2/8,8	0,08*
Idade	2,40±0,6 dias	16,3±5,9 dias	9,2±7,9 anos	<0,001 ^a
Phe-F (mg/dL)	0,80(0,6-1,7)	2,39(2,1-2,7)	8,52(5,4-12,3)	<0,001
Phe-MS (mg/dL)	1,23(1,1-1,4)	3,33(2,9-3,9)	10,0(7,1-14,3)	<0,001
Razão Phe/Tyr (MS)	0,82(0,6-1,1)	1,11(0,8-1,8)	15,2(3,5-23,6)	<0,001

H= homens; M=mulheres; Euro=Euro-Brasileiros; Afro=Afro-Brasileiros.

Phe= concentração de fenilalanina quantificada por métodos fluorométrico (Phe-F) ou espectrometria de massas (Phe-MS).

Razão Phe/Tyr= razão fenilalanina/tirosina obtida com o método espectrométrico (MS).

Os valores apresentados para os ensaios laboratoriais representam a média ± 1-desvio padrão ou mediana (25-75% da região interquartil).

Valores de probabilidade obtidos por ^aANOVA e os demais por Kruskal-Wallis.

* probabilidade, teste do chi-quadrado.